

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Liliane Simpson Lourêdo

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE
AMOSTRAS DE *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* ORIUNDAS DE CÃES
DOMÉSTICOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2014

Liliane Simpson Lourêdo

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE
AMOSTRAS DE *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* ORIUNDAS DE CÃES
DOMÉSTICOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Ana Luíza de Mattos Guaraldi
Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Lourêdo, Liliane Simpson

Isolamento, caracterização e potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium ulcerans* oriundas de cães domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro./Liliane Simpson Lourêdo-Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

100 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Boas e Ana Luíza de Mattos-Guaraldi

1. *Corynebacterium ulcerans*. 2. Virulência. 3. Vigilância Sanitária. I. Título

Isolation, identification and detection of candidate virulence factors of *C. ulcerans* isolates from domestic animals living in Rio de Janeiro metropolitan area

Liliane Simpson Lourêdo

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE
AMOSTRAS DE *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* ORIUNDAS DE CÃES
DOMÉSTICOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Verônica Viana Vieira (Doutora)
Instituto Oswaldo Cruz - IOC

Prescilla Emy Nagao Ferreira (Doutora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ana Luíza de Mattos-Guaraldi (Doutora) - Orientadora
Faculdade de Ciências Médicas - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dedico este mestrado aos meus pais, Gladys e Newton, que com toda dedicação e amor, sempre me mostraram que estudar era o melhor caminho. Mesmo não estando mais aqui, sei que participam da minha felicidade. Obrigada por tudo o que foram e são na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À profª Ana Guaraldi que me incentivou, apoiou e mostrou que era sim possível; sem ela eu não teria nem começado. Mais que orientadora, ela foi um anjo no momento mais difícil.

À profª Maria Helena pela orientação, profissionalismo e paciência e cuja generosidade foi além dos limites da pós-graduação.

Ao Prof Raphael e todo grupo do Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por todo o conhecimento dividido e ajuda inestimável.

Ao Dr Alexandre Dias por toda a colaboração prestrada.

À Dra. Cíntia Silva dos Santos pela co-orientação.

Aos professores e à Coordenação de Pós-graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela acolhida carinhosa e profissional.

Aos amigos Juliana, Higor e Cassius pelo companheirismo e dicas valiosas, os quais me ajudaram muito.

Ao meu irmão Leandro, que sempre teve uma palavra de apoio na hora em que eu precisava; longe na distância, perto no pensamento.

À minha família, minha prima Irene, meus amigos, que entenderam minha ausência e torceram por mim, meu obrigado.

Aos meus pais, Gladys e Newton, *in memoriam*.

E a Deus acima de tudo.

Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.

Luís de Camões

RESUMO

Corynebacterium ulcerans têm sido cada vez mais responsáveis por quadros de difteria zoonótica, além de outras infecções de humanos e de animais de companhia, incluindo cães. Uma vez que animais de companhia assintomáticos são capazes de transmitir o patógeno para os humanos em áreas urbanas e que escassas são as investigações sobre o potencial de virulência e o relato de casos dessas zoonoses em países em desenvolvimento, nesse sentido o presente estudo teve como objetivo o isolamento, caracterização e avaliação do potencial de virulência de amostras de *C. ulcerans* oriundas de animais domésticos domiciliados na área metropolitana do Rio de Janeiro. Os dados indicaram a presença de *C. ulcerans* em diferentes municípios. Além de humanos e de animais de abrigo, foram isoladas amostras não produtoras de toxina diftérica de cães assintomáticos domiciliados. As amostras isoladas (BR-AD41 e BR-AD61) apresentaram moderada sensibilidade a penicilina G e resistência a clindamicina. Os sistemas de fenotipagem Api-Coryne e Vitek 2 não permitiram a correta identificação de *C. ulcerans* em algumas oportunidades. Os microrganismos foram inicialmente caracterizados quanto à espécie e a presença do gene *tox* pela técnica de PCR multiplex. A confirmação do diagnóstico foi feita pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*. A relação genética entre amostras isoladas de humanos e cães assintomáticos no Rio de Janeiro (Brasil) foram analisadas pela técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE). Dentre os cinco pulsotipos demonstrados, os perfis IV e V exibindo $\geq 85\%$ de similaridade foram expressos pelas amostras BR-AD41 e BR-AD61 de cães residentes em um mesmo município. A heterogeneidade dos pulsotipos indicaram endemicidade de *C. ulcerans* no Rio de Janeiro. Independente da capacidade de produção de toxina diftérica, o potencial de virulência para humanos de amostras de *C. ulcerans* foi evidenciado pela habilidade de produzir biofilme em superfícies abióticas inclusive catéteres de poliuretano e a presença de gene *rpb* que codifica a toxina Shiga-like. *C. ulcerans* mostrou capacidade de aderir, invadir e sobreviver no interior de células epiteliais humanas em níveis variados, independente da presença de TD. Adicionalmente, a afinidade de *C. ulcerans* ao fibrinogênio (Fbg), fibronectina (Fn) e colágeno tipo I de humanos e a capacidade de causar rede de fibrina e lesões cutâneas em murinos foram também demonstradas. Concluindo, potencial patogênico de natureza multifatorial foi demonstrado para amostras de *C. ulcerans* que também podem ser encontradas colonizando a população de cães domiciliados e portanto em contato estreito com o homem na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Difteria, *Corynebacterium ulcerans*, zoonose, potencial de virulência

ABSTRACT

Corynebacterium ulcerans have been increasingly responsible for zoonotic diphtheria and other infections in humans and companion animals, including dogs. Since asymptomatic pets are able to transmit the pathogen to humans in urban areas and there are few investigations about virulence factors and case reports of this emerging zoonosis in development countries, this study aimed the isolation, identification and detection of candidate virulence factors of *C. ulcerans* isolates from domestic animals living in Rio de Janeiro metropolitan area. Data indicated the occurrence of *C. ulcerans* in different cities. Besides humans and dog shelter, sample of non-toxicogenic isolates were detected from asymptomatic companion dogs. The isolates (BR-AD41 e BR-AD61) showed moderate susceptibility to penicillin G and resistance to clindamycin. In some cases, a correct identification of *C. ulcerans* by the phenotypic assays API-Coryne and Vitek 2 was not conceivable. Species and toxigenicity of micro-organisms were initially characterized by a multiplex PCR assay. The diagnoses confirmation was made by 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing. The genetic relationship between human and asymptomatic dogs isolates was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) assay. Among the five types classified, the types IV and V exhibited similarity $\geq 85\%$ and were expressed by BR-AD41 and BR-AD61 isolates of companion dogs living in the same neighborhood. Heterogeneity of PFGE types indicated endemicity of *C. ulcerans* in Rio de Janeiro metropolitan area. Despite the ability of diphtheria toxin (DT) production, the virulence potential of *C. ulcerans* to humans was demonstrated by biofilm formation over abiotic surfaces, including polyurethane catheter and by the presence of *rpb* gene coding Shiga-like. Moreover, *C. ulcerans* demonstrated the ability to adhere to and survive within human epithelial cells at various levels, despite DT production. *C. ulcerans* affinity to human fibrinogen (Fbg), fibronectin (Fn) and type I collagen and formation of fibrinous skin lesions in mice were also observed. In conclusion, a multifactorial nature of the pathogenic potential was also demonstrated for *C. ulcerans* colonizing companion dogs in close contact to humans in the Rio de Janeiro metropolitan area.

Key words: Diphtheria, *Corynebacterium ulcerans*, zoonosis, virulence potential

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FLUXOGRAMA	Fluxograma de experimentos.....	37
FIGURA 1	Mapa da distribuição geográfica das amostras de <i>C. ulcerans</i> isoladas no presente estudo e em estudos anteriores.....	55
FIGURA 2	Caracterização fenotípica de <i>C. ulcerans</i>	56
FIGURA 3	Eletroforese em gel de agarose dos produtos do multiplex PCR.....	58
FIGURA 4	Perfis clonais (PFGE) das amostras de <i>C. ulcerans</i> isoladas de humanos e cães.....	60
FIGURA 5	Eletroforese em gel de agarose dos produtos do multiplex PCR, para a caracterização de toxigenicidade das amostras.....	61
FIGURA 6	Eletroforese em gel de agarose do gene <i>rpb</i> que codifica a toxina Shiga like.....	62
FIGURA 7	Formação de CAMP reverso em placa de ágar sangue de carneiro.....	62
FIGURA 8	Formação de úlceras e fibrina por amostras de <i>C. ulcerans</i>	63
FIGURA 9	Gráficos de aderência das amostras de <i>Corynebacterium ulcerans</i> às proteínas do plasma e matriz extracelular.....	66
FIGURA 10	Interação de <i>Corynebacterium ulcerans</i> com superfície de poliestireno.....	67
FIGURA 11	Imagens da formação de biofilme em cateter de poliuretano pelas amostras de <i>C. ulcerans</i>	68
FIGURA 12	Interação com células epiteliais humanas – linhagem HEp-2 - de amostras de <i>Corynebacterium ulcerans</i> isoladas de humano e de animais.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Casos de infecção devido a <i>Corynebacterium ulcerans</i> e <i>Corynebacterium diphtheriae</i> em animais relatados na literatura internacional.....	19
TABELA 2	Origem e características biológicas das amostras de <i>C. ulcerans</i> e <i>C. diphtheriae</i> usadas como controle.....	39
TABELA 3	Multiplex PCR para identificação simultânea de <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i> e detecção da produção de toxina ...	43
TABELA 4	Número de amostras e distribuição geográfica de BGPI isolados de animais domésticos (cães e gatos) na região metropolitana do Rio de Janeiro.....	54
TABELA 5	Número e características das amostras isoladas de BGPI e de <i>Corynebacterium ulcerans</i>	54
TABELA 6	Resultados esperados nas provas fenotípicas de <i>C. ulcerans</i> , <i>C. pseudotuberculosis</i> e <i>C. diphtheriae</i>	56
TABELA 7	Características e identificação das amostras de <i>Corynebacterium ulcerans</i> pelo API-Coryne e Vitek 2.....	57
TABELA 8	Porcentagem de similaridade após sequenciamento e determinação do número de pares de base dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> das amostras BR-AD41 e BR-AD61.....	59
TABELA 9	Perfis de susceptibilidade de amostras de <i>Corynebacterium ulcerans</i> de origens diversas a 12 agentes antimicrobianos avaliados pelo teste de difusão em disco.....	64

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

TD	Toxina diftérica
BGPI	Bacilos Gram positivos irregulares
CLA	Linfadenite caseosa
AS	gar sangue de carneiro
n	número
ND	Não declarado
rRNA	RNA ribossomal
PCR	Reação de polimerase em cadeia
<i>tox+</i>	Toxinognica
PLD	Fosfolipase D
DTP	Difteria, tétano e pertussis
TDA	Fragmento A da toxina diftrica\
TDB	Fragmento B da toxina diftérica
<i>cpp</i>	<i>Corynebacterial protease CP40</i>
<i>rbp</i>	<i>ribosome binding protein</i>
<i>nanH</i>	Neuraminidase H
HEp2	<i>Human epithelial cell line 2</i>
U937	<i>Human myelomonocytic leukemia cells</i>
<i>spa</i>	<i>Surface-anchored protein</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>

<i>rpoB</i>	RNA polimerase subunidade B
ME	Microrganismos emergentes
MRE	Microrganismos re-emergentes
DNase	Desoxirribonuclease
DAU	Duplo açúcar-uréia
CAMP	<i>Christie Atkins Munch-Petersen</i> (fator CAMP)
mPCR	multiplex PCR
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HUVET	Hospital Universitário de Medicina Veterinária Prof. Firmino Mársico Filho
UFF	Universidade Federal Fluminense
CACC	<i>Canadian Council on Animal Care</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
LDCIC	Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
°C	Graus Celsius
ACT	ágar-chocolate-telurito
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
GP	Gram positivo
ANC	<i>Anaerobe and Corynebacterium</i>
mL	mililitros
DNA	Ácido desoxirribonucleico

g	unidade gravitacional
μL	microlitros
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
dNTP	deoxinucleotídeo
q.s.p.	quantidade suficiente para
pb	pares de base
BHI	<i>brain-heart-infusion</i>
Seg	segundos
Min	minutos
mM	milimolar
D.O.	densidade óptica
PBS	tampão salina fosfato
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MIC	Concentração Inibitória Mínima
UFC	Unidade formadora de colônia
TE	tris-EDTA
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UEZO	Universidade Estadual de Zona Oeste
PBST	tampão salina fosfato –Tween
ECM	matriz extracelular
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
TMB	tetramethylbenzidine

M	molar
PBS-D	<i>Dulbecco modified phosphorus buffer saline solution)</i>
Fbg	Fibrinogênio
Fn	Fibronectina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA	18
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS	22
1.2.1 Difteria clássica	22
1.2.2 Outros tipos de infecções pelo <i>C. diphtheriae</i>	23
1.3 POTENCIAL ZONÓTICO DAS CORINEBACTÉRIA	23
1.3.1 Difteria zoonótica	24
1.4 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	25
1.5 IMUNIZAÇÃO	26
1.6 EPIDEMIOLOGIA	27
1.7 PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA	29
1.7.1. Citotoxicidade	30
1.7.2 Aspectos de adesividade e viabilidade intracelular	30
1.8. AVALIAÇÃO CLONAL	32
1.9 JUSTIFICATIVA	33
2 OBJETIVOS	36
3 METODOLOGIA	37
3.1 FLUXOGRAMA DE EXPERIMENTOS	37
3.2 ORIGEM DAS AMOSTRAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	38
3.3 ISOLAMENTO, CULTIVO E ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS BACTERIANAS ...	39
3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>C. ulcerans</i>	40
3.4.1 Testes bioquímicos convencionais	40
3.4.2 Sistema semi-automatizado API-Coryne System V3.0	40
3.4.3 Sistema automatizado VITEK	41
3.4.4 Reação em cadeia da polimerase - multiplex (mPCR)	42
3.4.5 Sequenciamento gênico após amplificação dos genes <i>rpoB</i> e 16s rRNA	44
3.4.5.1 Determinação das sequências nucleotídicas	45
3.5 PESQUISA DE POTENCIAL TOXINOGENICO DOS MICRORGANISMOS ATRAVÉS DE MÉTODOS GENOTÍPICOS E FENOTÍPICOS.....	45
3.5.1 Reação em cadeia da polimerase- multiplex (mPCR) para a pesquisa do gene <i>tox</i>	45
3.5.2 Pesquisa de toxina <i>Shiga-like</i> (gene <i>rpb</i>)	46
3.5.3 Teste de CAMP	46

3.5.4 Avaliação do potencial toxinogênico <i>in vivo</i>	46
3.6 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	47
3.7 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CLONES ATRAVÉS DE PFGE	47
3.8 INTERAÇÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATOS ABIÓTICOS.....	49
3.8.1 Avaliação de interação bacteriana com superfície abióticas hidrofóbicas em microplacas de poliestireno.....	49
3.8.2 Pesquisa da capacidade de produção de biofilme em cateter de poliuretano pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	49
3.9 INTERAÇÃO BACTERIANA COM PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E DE MATRIZ EXTRACELULAR HUMANOS.....	50
3.10 ENSAIOS DE ADERÊNCIA E VIABILIDADE INTRACELULAR BACTERIANA EM CÉLULAS EPITELIAIS HUMANAS DE LINHAGEM HEp2.....	51
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4 RESULTADOS	53
4.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	53
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>C. ulcerans</i>	55
4.3 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS DE <i>C.ulcerans</i>	58
4.3.1 Multiplex PCR	58
4.3.2 Sequenciamento	58
4.3.3 Determinação dos perfis clonais pelo PFGE	59
4.4 CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAL TOXINOGENICO DE <i>C. ulcerans</i>	60
4.4.1 Toxina diftérica e toxina <i>Shiga-like</i>	60
4.4.2 Produção de fosfolipase D	62
4.4.3 Avaliação de toxigenicidade <i>in vivo</i>	63
4.5 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	64
4.6 PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR E PLASMA	65

4.7 INTERAÇÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATOS ABIÓTICOS	65
4.7.1 Avaliação de interação bacteriana com superfície abiótica e hidrofóbica em microplacas de poliestireno	65
4.7.2 Pesquisa da capacidade de produção de biofilme em cateter de poliuretano pela técnica de MEV	68
4.8 ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM CÉLULAS EPITELIAIS HUMANAS (HEp2).....	68
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	88
ANEXO B - LEITURA E CÓDIGO DO API CORINE	89
APÊNDICE A - TRABALHO APRESENTADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A DISSERTAÇÃO	90
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A DISSERTAÇÃO	91

1 INTRODUÇÃO

A difteria é uma doença infectocontagiosa, de evolução aguda com manifestações locais e sistêmicas que permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade nos diferentes continentes, inclusive em países com programas efetivos de imunização infantil (GALAZKA, 2000, BITRAGUNTA et al, 2010, KHAN et al, 2007, WANG; LONDON 2009, MAN et al, 2010, SAIKYA et al, 2010). Sua forma clássica está associada ao *Corynebacterium diphtheriae* produtor de toxina diftérica (TD) e se caracteriza pela formação de pseudomembranas acinzentadas no sítio de infecção, em decorrência dos efeitos da liberação da TD e da resposta do hospedeiro (HADFIELD et al, 2000) e sua forma clínica mais comum é a faríngea (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Segundo Mortimer e Whartom (1999), as primeiras descrições de epidemias datam do fim do século primeiro da era Cristã, quando Areteo da Capadócia, em viagens pela Ásia, observou indivíduos com lesões na garganta que passaram a ser chamadas de “úlceras siríacas” e “úlceras egípcias”. No século III, Coelio Aureliano já descrevia quadros de anginas graves, o crupe, a afonia diftérica e eliminação de fluídos pelo nariz. No século XVI, epidemias de difteria foram descritas em diversos países da Europa e receberam várias denominações, tais como “angina pestinencial”, “mal sufocante”, “garrotinho”, “doença anginosa”, “doença estrangulatória” e “mal gangrenoso da garganta”. As epidemias de difteria estenderam-se através do século XVII alcançando o continente Americano. Apenas em 1821, Bretonneau descreveu e caracterizou a difteria, como sendo uma doença infecciosa.

As espécies de corinebactérias constituem um grupo de microrganismos aeróbios, bacilos Gram positivos irregulares (BGPI), imóveis, não esporulados e catalase-positivos, que podem provocar processos infecciosos tanto em homens como em animais (SETO et al, 2008). Três espécies de corinebactérias podem potencialmente carrear o gene *tox* e causar difteria clássica: *C. diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* (WAGNER et al, 2010).

C. ulcerans foi isolado pela primeira vez em lesão de garganta de um paciente com quadro de doença respiratória diftérica, em 1926, por Gilbert e Stewart (TROST et al, 2011). Esse microrganismo, classicamente, é o agente etiológico de quadros diversos de infecções em animais, mais notadamente mastites no rebanho bovino, porém pode ser também agente etiológico de necroses em mucosas e síndromes do trato respiratório inferior, com pneumonia

e formações de nódulos pulmonares (HATANAKA, 2003) em outras espécies, incluindo cães, gatos, porcos, cavalos, lontras, macacos e javalis (**Tabela 1**).

C. pseudotuberculosis é o agente etiológico da linfadenite caseosa (CLA) em pequenos ruminantes, como carneiros e cabras. A doença se apresenta como abscessos cutâneos, pneumonia, artrite, pericardite e mastite. Esse microrganismo também pode estar envolvido em infecções que causam linfadenite em cavalos e linfangite ulcerativa em vacas (PERKINS et al, 2004, BAIRD; FONTAINE, 2007, SHARPE et al, 2010). Embora infecções por *C. pseudotuberculosis* raramente afetem o homem, foram relatados casos de linfadenite, relacionados a infecções ocupacionais, atingindo trabalhadores rurais que possuem contato frequente com o rebanho ou que trabalhem em abatedouros (GUIMARÃES et al, 2011). Na Austrália, em 1997, foram descritos dez casos de infecção humana por *C. pseudotuberculosis*, confirmando sua presença em áreas de criação de ovelhas e carneiros (PEEL et al, 1997).

1.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA

As corinebactérias são coradas pelo Gram e se mostram como bacilos suavemente curvados com extremidades arredondadas, conferindo um aspecto de clava e com arranjo típico em “letra chinesa”. Podem ser facilmente isoladas em meio ágar contendo 5% de sangue de carneiro (AS). Meio contendo telurito de potássio inibe o crescimento de outras bactérias não-corineformes e pode ser usado como um meio seletivo para isolar as espécies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, gerando colônias negras. Testes bioquímicos são utilizados na identificação de corinebactérias como: catalase, motilidade, redução de nitrato e hidrólise de ureia e de esculina, fermentação de açúcares e reação de CAMP (FUNKE; BERNARD, 2009).

Outros métodos baseados em testes bioquímicos incluem o sistema semi-automatizado API Coryne, que contém painéis de identificação em seu banco de dados e pode identificar corretamente 90,5% das amostras (FUNKE; BERNARD, 2009) e o automatizado Vitek, que também possui um banco de dados para amostras clínicas.

Tabela 1

Casos de infecção devido a *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium diphtheriae* em animais relatados na literatura internacional

País (ano)	Hospedeiro (nº de cepas isoladas)	Produção de toxina diftérica	Condição clínica	Contatos animais (nº)	Óbito de animais	Observações
<i>C. ulcerans</i>						
Romênia (1977)	Macaco (1)	ND	Dermatite Granulomatosa	Sim (271 macacos)	ND	
Inglaterra (1984)	Vaca (ND)	ND	Assintomático	Sim	Não	Proprietário se recuperou da infecção
Inglaterra (1984)	Vaca (ND)	Positivo	Assintomático	Sim	Não	Proprietário se recuperou da infecção
Canadá (1988)	Esquilos (63)	Positivo	Dermatite gangrenosa	Não (287 esquilos)	Sim (6)	Os 57 animais sobreviventes receberam antibioticoterapia
EUA (2000)	Macacos (26)	Negativo	Lesões de pele	Não	ND	Microorganismos foram isolados de 56% das lesões de pele e de 3% das amostras de orofaringe
Espanha (2006)	Camelo (1)	ND	Linadenite caseosa	ND	ND	
Escócia (2002)	Gato (2)	Positivo	Secreção nasal	Não	Não	
Inglaterra (2002)	Lontra (2)	Positivo	Infecção pulmonar	ND	Sim (1)	

País (ano)	Hospedeiro (nº de cepas isoladas)	Produção de toxina diftérica	Condição clínica	Contatos animais (nº)	Óbito de animais	Observações
Inglaterra (1986-2003)	Gatos (7)	Positivo	Secreção nasal	ND	Não	Os mesmos ribotipos isolados de 50 indivíduos foram isolados de gatos, sugerindo que esses animais podem ter sido os reservatórios
Japão (2004)	Orca (2)	Positivo	Pneumonia purulenta	ND	Sim	Cepas isoladas do sangue e tecido pulmonar de 2 orcas (macho e fêmea) do mesmo aquário
França (2005)	Cão (1)	Positivo	Lesão labial crônica	ND	Eutanásia (1)	Adulto se recuperou de difteria clássica. O patógeno foi isolado de material de lesão labial, tonsilas e narinas
Argentina (2005)	Cabra (1)	ND	Abscesso cerebral	ND	Eutanásia (1)	Cepas isoladas de abscesso cerebral e fluido cerebroespinhal
Inglaterra (2006)	Cão (2)	Positivo	Assintomático	Sim (2)	Não	Óbito do proprietário
França (2006)	Cão (1)	Positivo	Assintomático	Sim (1)	Não	Proprietário se recuperou de difteria clássica
Japão (2008)	Leão	Negativo	Sepse	ND	ND	Cepa isolada do sangue
Japão (2009)	Cão (1)	Positivo	Assintomático	Sim (65 cães)	Não	Cepa isolada de orofaringe
Alemanha (2009)	Porco (1)	Positivo	Assintomático	Sim (19 porcos e 1 cão)	Não	Adulto se recuperou de difteria clássica. Cepa isolada de humano foi idêntica à isolada do porco. Investigação de 3 contatos foi negativa

País (ano)	Hospedeiro (n° de cepas isoladas)	Produção de toxina diftérica	Condição clínica	Contatos animais (n°)	Óbito de animais	Observações
Brasil (2010)	Cão (1)	Negativo	Assintomático	Sim (60 cães)	Não	Cepa isolada de nasofaringe. O estado de portador foi eliminado pelo uso de antibioticoterapia. Não houve contato humano
EUA (2010)	Cão (1)	Negativo	Broncopneumonia	Não	Não	Dois cepas distintas foram isoladas do mesmo cão num período de 3 meses. O proprietário não foi detectado como portador
Suíça (2012)	Gato (1)	Negativo	Lesões em boca e membro	ND	Não	Proprietário se recuperou. Uma cepa idêntica foi isolada da boca do gato. Vacinação com toxóide diftérico feita dez anos antes
Japão (2013)	Macacos (30)	Positivo	Assintomáticos	Sim	Não	Cepas isoladas em criatório de macacos
EUA (2014)	Furão (5)	Negativo	Secreção em implante cefálico	Sim	Não	Animais usados em experimentos
<i>C. diphtheriae</i>						
EUA (2010)	Gato (2)	Negativo	Otite severa	Sim (3 gatos, 2 cães e 1 cavalo)	Não	4 cepas de <i>C. diphtheriae</i> var <i>belfanti</i> foram isoladas das orelhas de 2 gatos. Investigação de 10 contatos humanos foi negativo
Irlanda (2010)	Cavalo (1)	Positivo	Lesões de pele	ND	Não	Cepa de <i>C. Diphtheriae</i> var <i>gravis</i> foi isolada do pus. Investigação de contatos humanos foi negativa

ND: não declarado. Fonte: *Corynebacterium ulcerans*: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. DIAS et al, Rev. Saúde Pública, v. 45, p. 6, 2011a.

As três espécies citadas são relacionadas filogeneticamente. O sequenciamento do gene 16S rRNA é indicado para a diferenciação entre espécies, desde que elas apresentem mais de 3% de divergência (FUNKE; BERNARD, 2009). No caso das três espécies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, elas possuem menos de 2% entre si; *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* menos de 1%. É necessário o sequenciamento do gene *rpoB*, por possuir um grau mais elevado de polimorfismo entre as espécies (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, FUNKE; BERNARD, 2009). A presença do gene *tox* pode ser avaliada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) que detecta os fragmentos A e/ou B da TD (NAKAO; POPOVIC, 1997), porém não deve ser usada como única prova. A expressão da toxina também deve ser avaliada. Amostras *tox+* nem sempre expressam o gene (FUNKE; BERNARD, 2009). A diferenciação das três espécies também é possível através de uma PCR multiplex, com primers específicos para cada espécie (TORRES et al, 2013).

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS

1.2.1 Difteria clássica

A difteria clássica é causada pelo *C. diphtheriae* toxinogênico e se apresenta pela presença de pseudomembranas no local de infecção, o que caracteriza um sinal patognômico da doença. Primariamente são afetados os órgãos do aparelho respiratório superior. Na forma mais comum observa-se além da faringite com dor local, aumento dos linfonodos cervicais, o chamado pescoço de touro. Esse pode ser um sinal de alerta para complicações, como endocardites. Em casos mais graves, ocorre a difteria maligna ou hipertóxica, o início é súbito e além do pescoço de touro, ocorre hipotensão arterial, miocardite e neurite, sendo mais que 50% dos casos fatais (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011).

1.2.2 Outros tipos de infecções pelo *C. diphtheriae*

A difteria também pode apresentar infecções cutâneas, com aspecto de úlceras, mais comuns em países tropicais (WAGNER et al 2010), por vezes associadas as lesões por Leishmaniose (FORMIGA; MATTOS-GUARALDI, 1993), picadas de insetos e traumatismos. As infecções diftéricas cutâneas são mais contagiosas que as respiratórias (MaCGREGOR, 1990). Recentemente vem ocorrendo um aumento no número de casos em que os pacientes, maioria adulta e parcialmente imunizada, apresentam somente uma das complicações da difteria, sem as pseudomembranas ou qualquer outra complicação em faringe. Outra mudança no quadro clínico da difteria são amostras não toxinogênicas de *C. diphtheriae* sendo encontradas como agentes em quadros invasivos de sepse, endocardite, osteomielite e artrites (HIRATA JR et al, 2002, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011).

1.3 POTENCIAL ZOONÓTICO DAS CORINEBACTÉRIAS

As espécies potencialmente produtoras de TD podem provocar processos infecciosos tanto em humanos como em animais (SETO et al, 2008, WAGNER et al, 2010). Embora *C. diphtheriae* seja considerado um patógeno humano, foi relatado o isolamento de *C. diphtheriae* no caso de um felino com otite severa (HALL et al, 2010), o que alertou a comunidade científica para o potencial zoonótico desse patógeno. Além disso, se tem observado um aumento do número de casos de difteria zoonótica devido ao *C. ulcerans*, principalmente em países desenvolvidos, tendo como reservatórios cães e gatos. Na Inglaterra dos 13 casos de difteria por *C. ulcerans*, entre 2003 e 2008, todos estavam relacionados ao contato com animais de companhia (WAGNER et al, 2010, DIAS et al, 2011a). Antes, esse patógeno era associado principalmente ao gado leiteiro como sendo seu principal reservatório, e consumidores de leite *in natura* e trabalhadores do meio rural formavam o grupo de risco

(BONMARIN et al, 2009). Adicionalmente, entre 2005 e 2008, 4 casos de difteria por *C. pseudotuberculosis* foram identificados na Europa e somente um dos pacientes relatou contato com animais de fazenda (WAGNER et al, 2012).

Existe uma carência de informações sobre a colonização e doenças causadas por corinebactérias potencialmente produtoras de TD em animais e humanos, devido parcialmente a uma triagem inadequada desses patógenos no diagnóstico laboratorial, inclusive no Brasil. Os profissionais da área da saúde encontram-se atualmente despreparados para reconhecer e identificar as infecções em humanos causadas por *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* em suas formas toxigenicas e atoxigenicas. Esse fato ressalta a necessidade da utilização de métodos de identificação precisos e rápidos na presença desses patógenos (DIAS et al, 2011a).

Os fatores que vêm favorecendo o surgimento de casos de infecções pelo *C. ulcerans* em homens e animais permanecem incompreendidos, embora seja possível que os fatores de virulência estejam se expressando em decorrência da pressão seletiva associada a condições socioeconômicas, como maior densidade demográfica e condições higiênico-sanitárias deficientes, aliadas ao convívio íntimo com animais de companhia (PESAVENTO, 2007).

1.3.1 Difteria zoonótica

Nos últimos anos vêm ocorrendo uma mudança no perfil epidemiológico da difteria, e o número de casos onde o agente etiológico identificado é o *C. ulcerans* vem aumentando em vários países na Europa, inclusive superando o número de casos por *C. diphtheriae*, como na Inglaterra e França (TIWARI et al, 2008, BONMARIN et al, 2009, CONTZEN et al, 2011, WAGNER et al, 2012). Além da Europa, Estados Unidos e Japão vêm identificando com frequência a presença de *C. ulcerans* como patógeno responsável por quadros clínicos de difteria (CDC, 2011), alguns deles atípicos (KIMURA et al, 2010, URUKAWA et al, 2013). A difteria por *C. ulcerans* se apresenta de forma bem similar à causada pelo *C. diphtheriae*, com todos os sinais relacionados à presença de TD: doença respiratória, com sangramento nasal, lesões em árvore brônquica, com formação de pseudomembrana, comprometimento dos linfonodos cervicais (DIAS et al, 2011, WAGNER et al, 2012) e lesões cutâneas típicas de difteria (DIAS et al, 2011, WAGNER et al, 2001). A ocorrência de necrose, ulceração de

mucosas e manifestações em trato respiratório inferior, como granulomas e pneumonia, são atribuídos também à presença de TD e fosfolipase D (PLD) (DIAS et al, 2011a).

1.4 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos têm sido usados para prevenir a produção e propagação da TD em pacientes sintomáticos, assim como evitar o surgimento da doença clínica, pela disseminação a partir de um portador assintomático ou de contatos estreitos com colonizados (PEREIRA et al, 2008).

A penicilina-G e a eritromicina são as drogas de escolha para a erradicação do bacilo diftérico. O primeiro deles, um dos mais antigos antimicrobianos conhecidos, pertence à categoria dos β -Lactâmicos, capaz de interferir na síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana. A eritromicina atua inibindo a síntese de proteínas da célula procaríota, sendo um dos antimicrobianos mais ativos *in vitro* contra o bacilo diftérico (FORMIGA, 1986, MACAMBIRA; FORMIGA; FORMIGA, 1994). A eritromicina e a sua molécula modificada, a azitromicina, são as drogas mais utilizadas como substitutos naturais da penicilina-G, sendo usadas em pacientes alérgicos à penicilina, infectados com amostras toxinogênicas e em portadores assintomáticos (WILSON, 1995, GOMES, 2007). Entretanto, resistência à penicilina G, à oxacilina, à eritromicina, à rifampicina, à tetraciclina e à clindamicina tem sido relatada (FORMIGA; MATTOS-GUARALDI, 2001, VON HUNOLSTEIN et al, 2003, PEREIRA et al, 2008).

C. ulcerans, da mesma forma que *C. diphtheriae*, apresenta sensibilidade para eritromicina, azitromicina, claritromicina e penicilina, drogas de escolha no tratamento quando ocorrem infecções em que é o agente causador (WAGNER et al, 2010). Entretanto, amostras resistentes à clindamicina já foram descritas (KATSUKAWA et al, 2012).

C. pseudotuberculosis é sensível à penicilina G, à amoxicilina, aos macrolídeos, às tetraciclina e às cefalosporinas (PEEL et al, 1997), porém algumas amostras já foram descritas como resistentes à estreptomicina, à neomicina e à penicilina (DORELLA et al, 2006).

1.5 IMUNIZAÇÃO

Atualmente, a difteria é considerada uma doença controlada em países desenvolvidos que possuem um programa vacinal eficiente, porém permanece endêmica em vários países em desenvolvimento. A proteção contra a difteria é adquirida pela vacinação com o toxóide diftérico, ocorrendo uma queda no nível de anticorpos no final da infância e adolescência (GALAZKA, 2000, DIAS et al, 2010). A difteria pode acometer indivíduos parcialmente imunizados independente de raça, cor e sexo. Epidemias ocorrem quando o declínio parcial de imunidade se soma à falta de reforço vacinal e menor exposição ao bacilo (GALAZKA; ROBERTSON, 1995, DURBARCÃ, 1999, MATTOS-GUARALDI et al, 2003, ÖLANDER et al, 2009, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011).

No Brasil a cobertura vacinal atinge 99% da população infantil (DIAS et al, 2011a, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011), porém a doença ainda permanece de forma endêmica, ocasionando surtos epidêmicos, indicando falha na cobertura vacinal. Por exemplo, no Maranhão, onde a vacinação atingiu apenas 56% das crianças, ocorreu um surto de difteria em 2010 (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011).

O esquema de vacinação é iniciado aos dois meses, com a aplicação da vacina pentavalente (DTP - difteria, tétano e pertussis + meningite + Hepatite B), reforço aos quatro e seis meses com a vacina pentavalente, e reforço aos seis meses e quatro anos com a DTP. A partir daí, reforço a cada dez anos, durante toda a vida (BRASIL, 2012).

A vacinação com o toxóide diftérico (vacina DPT), e em outras combinações, confere proteção apenas contra a toxina diftérica e não contra a colonização ou infecção pelo microrganismo. A imunização reduz a severidade e o número de casos da doença (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011). Porém, a vacinação com o toxóide diftérico não confere imunidade contra a difteria zoonótica causada pelo *C. ulcerans*, uma vez que a maioria dos casos ocorreu em pacientes que haviam sido total ou parcialmente imunizados com o toxóide diftérico (DIAS et al, 2011, WAGNER et al, 2012). Relatos recentes indicam diferenças na sequência de nucleotídeos do gene *tox* de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, mesmo entre amostras de *C. ulcerans* (CASSIDAY et al, 2008, DIAS et al, 2011a, SEKIZUKA et al, 2012). Esse fato pode contribuir para que indivíduos vacinados com o toxóide diftérico não apresentem uma imunização total contra a toxina produzida por amostras de *C. ulcerans*.

1.6 EPIDEMIOLOGIA

A difteria clássica é uma doença de evolução aguda que acomete crianças de até 10 anos, e o maior número de casos e óbitos ocorre na faixa até os 4 anos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Nos anos 80 acreditava-se que a difteria seria erradicada da Europa até 2000, tão baixo era o número de casos, porém, nos anos 90, uma epidemia assolou os países da antiga União Soviética, alguns países da Europa Ocidental e Ásia. A Organização Mundial de Saúde (OMS) determinou a instauração de uma equipe para controlar a maior epidemia nos últimos tempos, através da vigilância de casos, diagnóstico e atendimento rápido (MATTOS-GUARALDI; HIRATA J; DAMASCO, 2011). O enfraquecimento do programa vacinal, devido a informações equivocadas em relação à aplicação em crianças, aliado ao uso de uma vacina de baixa qualidade são as possíveis causas do surto epidêmico. Além disso, a ruptura da União Soviética levou a um grande deslocamento populacional e facilitou a disseminação da difteria entre os países afetados (WAGNER et al, 2012). Uma das características dessa epidemia foi uma maior incidência entre jovens e adultos, e a ausência do sinal característico da difteria, que é a formação da pseudomembrana diftérica. Com isso os profissionais não estavam preparados para diagnosticar e tratar corretamente os doentes, o que possibilitou ainda mais a expansão da doença (MATTOS-GUARALDI; HIRATA J; DAMASCO, 2011). Outro fator que pode ser determinante no surgimento de novas epidemias é a ampla diversidade genética que o *C. diphtheriae* apresenta, sendo suscetível a mutações que poderiam produzir cepas providas de novas características adaptativas, facilitando a ocorrência de epidemias (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011).

Atualmente o número de casos confirmados de difteria tem crescido em todo mundo, apesar de ser uma doença imunoprevenível, o que mantém a possibilidade de ocorrência de surtos epidêmicos, com uma elevada taxa de morbi-letalidade. Fatores predisponentes, tais como condições socioeconômicas e higiênicas inadequadas, além de quadros de imunocomprometimento e recusa à imunização favorecem o surgimento de infecções por *C. diphtheriae*. Além disso, quadros de infecções invasivas por amostras atoxinogênicas vêm aumentando, como endocardites, abscesso esplênico e osteomielite.

Na última década, o número de casos de infecção por *C. ulcerans*, inclusive quadros de difteria, tem crescido e superado o número de casos de infecção por *C. diphtheriae* nos países desenvolvidos (CONTZEN et al, 2011), a maior parte na Europa, América do Norte e Ásia (CDC, 2000, VON HUNOLSTEIN et al, 2003, DEWINTER; BERNARD; ROMME,

2005, BONMARIN et al, 2009, KOMYIA et al, 2010, PUTONG et al, 2011, WAGNER et al, 2012). Alguns casos foram relacionados à transmissão animal (TAYLOR et al, 2010, WAGNER et al, 2010, KIMURA et al, 2011). Além disso, outros tipos de infecções por *C. ulcerans* em humanos foram descritos, inclusive no Brasil (MATTOS-GUARALDI et al, 2008). Recentemente houve o relato de caso de úlcera cutânea por *C. ulcerans* em que a fonte de infecção foi um objeto, o que demonstra a presença e circulação do *C. ulcerans* no ambiente e a mudança no perfil da difteria (LEITZ; LEITZ; SCHALLER, 2013).

Cepas toxinogênicas de *C. ulcerans* foram também isoladas causando infecções em várias espécies animais domésticas, como bovinos, suínos, cães e gatos (DE ZOYSA et al, 1995, KATSUKAWA et al, 2009, SCHUHEGGER et al, 2009, SYKES et al, 2010) e animais silvestres (CONTZEN et al, 2011). Na região metropolitana do Rio de Janeiro, foi encontrado em um abrigo para animais um cão assintomático portador de *C. ulcerans* atoxinogênico (DIAS et al, 2010) numa população de 60 animais analisada, enfatizando, portanto, a importância de animais de companhia como possíveis reservatórios em nosso país.

Na Inglaterra, de um levantamento feito entre 2000 e 2009, a maioria dos casos foi detectada em mulheres de meia idade. Esse fato pode estar relacionado ao fato de mulheres terem maior contato com animais de companhia aliado a queda na imunidade (WAGNER et al, 2012). Embora Inglaterra, França e outros países da Europa relatem regularmente o isolamento de *C. ulcerans*, incluindo amostras toxinogênicas, é improvável que somente nessas regiões esse patógeno seja encontrado. A habilidade em detectar a presença de *C. ulcerans* é um potencial indicador de uma vigilância em saúde eficiente. Além do Reino Unido, poucos países mantêm uma rotina laboratorial estabelecida (MATTOS GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011), com notificação obrigatória. No Brasil, em vista das mudanças ocorridas na epidemiologia da difteria, o Ministério da Saúde emitiu uma Nota Técnica - Nº 25.000.140.269/2010-39- (BRASIL, 2010b), alertando sobre a situação da doença no país e sobre a possibilidade de difteria zoonótica, assim como estabelecimento de medidas de notificação, controle e tratamento da difteria.

Já a prevalência da linfadenite caseosa é alta em várias regiões do mundo, incluindo a América do Sul; no Brasil ela é endêmica, podendo atingir 70% do rebanho ovino/caprino. Embora seja rara a infecção de *C. pseudotuberculosis* no homem, sua erradicação do rebanho é difícil devido à resposta ineficaz ao tratamento com antimicrobianos sendo recomendada a excisão cirúrgica dos abscessos e dos linfonodos afetados (PAVAN et al, 2011).

1.7 PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA

A TD é codificada pelo gene *tox* que está presente em bacteriófagos capazes de infectar *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* (WONG; GROMAN, 1984). É o fator de virulência mais bem estudado dessas espécies, sendo a TD composta por dois fragmentos, A e B. O fragmento A (TDA) é o que possui atividade enzimática, inibindo a síntese proteica e induzindo a apoptose. O fragmento B (TDB) não possui atividade enzimática, porém é indispensável para que TDA penetre no citoplasma da célula (TRABULSI; ALTERTHUM 2008). Além disso, as espécies *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* possuem em seus genomas genes homólogos aos encontrados em *C. diphtheriae*, que codificam outros fatores de virulência, como a fosfolipase D (PLD - principal fator de virulência dessas espécies), uma enfiingomielinase que possui atividade pró-inflamatória, aumentando a permeabilidade vascular e facilitando a disseminação do agente infeccioso no hospedeiro (MCNAMARA; CUEVAS; SONGER, 1995, TROST et al, 2011). Outros fatores de *C. ulcerans* incluem o gene *cpp* (*Corynebacterial protease CP40*), que possui forte similaridade ao domínio alfa da endoglicosidase E de *Enterococcus fecalis*, com atividade glucosaminidase, promovendo a degradação de ribonuclease; o gene *rbp*, que codifica a proteína de ligação do ribossoma, com similaridade à toxina *Shiga-like* de *Escherichia coli*; a neuramidase NanH, que modifica a habilidade do hospedeiro em responder às infecções bacterianas, favorecendo a adesão e invasão das células pela bactéria (TROST et al, 2011).

Microrganismos frequentemente aderem a superfícies bióticas e abióticas, incluindo dispositivos médico-hospitalares, como cateteres venosos, dispositivos intrauterinos, válvulas cardíacas, cateteres de diálise peritoneal, cateteres urinários e próteses de articulações, formando biofilmes compostos de polímeros extracelulares. Dessa forma, as bactérias podem se tornar altamente resistentes ao tratamento antimicrobiano, e fortemente aderidas às superfícies (DONLAN, 2001). Infecções por bactérias formadoras de biofilme são uma complicação clínica pela ocorrência de infecções graves. Microrganismos de fontes exógenas invadem o local de inserção dos dispositivos e migram ao longo de sua superfície, formando os focos de colonização. Uma amostra atoxinogênica de *C. diphtheriae* foi isolada de um cateter de nefrostomia em paciente com neoplasia (GOMES et al, 2009). Foi relatado

recentemente que *C. ulcerans* possui estruturas de aderência (TROST et al, 2011), sendo potencialmente capaz de aderir a substratos abióticos formando biofilme.

1.7.1 Citotoxicidade

Os microrganismos possuem inúmeros mecanismos para evitar a ação do sistema imune, conseqüentemente colonizando e causando danos ao hospedeiro. A TD presente no *C. diphtheriae*, assim como no *C. ulcerans*, tem tropismo por miocárdio, sistema nervoso, rins e suprarrenais (DIAS et al, 2011b), sendo capaz de promover rearranjo do citoesqueleto e inibição da síntese proteica, provocando lise celular e fragmentação do DNA nuclear, levando a processos de apoptose e necrose de células (SANTOS et al, 2010). Adicionalmente, a fosfolipase D (PLD) presente em *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, somada à sua ação pró-inflamatória, possui atividade dermonecrótica e em altas doses é letal para espécies de laboratório e domésticas. Algumas de suas atividades biológicas são encontradas de forma semelhante em esfingomielinases presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (DORELLA et al, 2006, DIAS et al, 2011b).

Em um estudo do genoma de *C. ulcerans* (TROST et al, 2011), foi detectado o gene *rpb* em uma das amostras. Esse gene codifica a proteína de inativação ribossomal que demonstrou ter similaridade à cadeia A da toxina *Shiga like* encontrada em *Escherichia coli*. Embora a similaridade seja fraca, a sequência gênica do *rpb* apresenta todos os aminoácidos necessários a atividade catalítica N-glicosidase altamente conservados. A biossíntese de proteínas é inibida, de maneira semelhante à TD, e mimetiza os sinais sistêmicos da difteria.

1.7.2 Aspectos de adesividade e viabilidade intracelular

Adesão ao tecido do hospedeiro é o primeiro passo para colonização e infecção microbiana e promove a sobrevivência do patógeno no fluido de perfusão (VENGADESAN; NARAYANA, 2011). *C. diphtheriae* apresenta afinidade preferencialmente por mucosas e

pele como sítios de colonização. As propriedades adesivas de *C. diphtheriae* vêm sendo estudadas, e aspectos como hidrofobicidade (MATTOS-GUARALDI et al, 1999), presença de estruturas de aspectos fimbriais (YANAGAWA; HONDA, 1976; VENGADESAN; NARAYANA, 2011) e capacidade de aglutinar hemácias humanas e de animais (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1986, MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991, MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1992) parecem ser importantes no mecanismo de aderência (GOMES, 2007). Os quadros clínicos invasivos que vêm aumentando em frequência parecem envolver padrões agregativos de aderência, como no caso de endocardites. Essa capacidade de aderência favorece a disseminação sistêmica da bactéria pelo organismo, através da ruptura da barreira sanguínea. Foi demonstrado que amostras de *C. diphtheriae* responsáveis por causar endocardite mostravam padrões de aderência em células respiratórias (HEp2) (HIRATA JR. et al, 2008).

A habilidade das corinebactérias em migrar através da barreira epitelial é importante nos estágios iniciais da infecção. Agentes infecciosos em meio intracelular têm sua sobrevivência favorecida, pois evitam a atividade de células do sistema imune e a ação de antimicrobianos. A possibilidade em sobreviver intracelularmente pode favorecer infecções endovasculares e levar ao surgimento de focos de infecções em outros locais do organismo, independente da produção de toxina diftérica (SANTOS et al, 2010).

Algumas bactérias Gram-positivas, como as corinebactérias, têm a capacidade de causar infecções invasivas, devido em parte, à opsonização na ausência de anticorpos específicos. A fagocitose não-opsônica constitui um meio do patógeno internalizar e sobreviver no compartimento intracelular, como observado anteriormente para *Streptococcus agalactiae* (SANTOS et al, 2010). Amostras de *C. diphtheriae* toxinogênicas e atoxinogênicas são capazes de aderir, invadir e sobreviver em macrófagos da linhagem U-937 através da fagocitose não-opsônica. As amostras toxinogênicas conseguem invadir em maior número, porém somente as amostras atoxinogênicas se mantêm viáveis após um período de 24 horas. O menor número de amostras atoxinogênicas fagocitadas pode estar relacionado a um mecanismo de sobrevivência da bactéria, pelo qual ela evita a fagocitose por células do sistema imune e consegue se manter viável no organismo e causar doença. Além disso, *C. diphtheriae* mostrou-se capaz de induzir apoptose e necrose, independente de produção de TD na linhagem de macrófagos U-937 (SANTOS et al, 2010).

Em células HEp-2 foram identificadas alterações morfológicas, como vacuolização, desarranjo nuclear e processo de apoptose após tratamento com invasinas (DIP0733), proteínas não-fimbriais expostas na superfície de bactérias, como *C. diphtheriae*, e capazes de

aderir a eritrócitos e células epiteliais (SABBADINI et al, 2012). Dessa forma, outros fatores de virulência além da TD estão envolvidos na capacidade em colonização e infecção.

C. ulcerans possui em seu genoma genes similares aos encontrados no *C. diphtheriae* (*spaDEF* e *spaBC*), que codificam estruturas de adesão, chamadas fímbrias ou *pili*, que permitem a interação com diferentes receptores da célula hospedeira, facilitando a ação dos fatores de virulência e a invasão intracelular (SANTOS et al, 2010, TROST et al, 2011).

Em um experimento recente, *C. ulcerans* mostrou habilidade em causar artrite através de disseminação hematogênica em camundongos, com alterações histopatológicas nas articulações como edema, infiltrado inflamatório e lesão do tecido ósseo. As amostras de *C. ulcerans* avaliadas, 809 e CDC KC279, exibiram potenciais artritogênicos distintos, porém mais acentuados do que amostras de *C. diphtheriae* (DIAS et al, 2011b).

1.8. AVALIAÇÃO CLONAL

O objetivo de estudos de tipagem molecular de microrganismos, como a técnica de *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), é provar, por meios laboratoriais, que amostras isoladas em surtos epidêmicos de uma doença podem estar geneticamente relacionadas, representando a mesma amostra. Adicionalmente, a PFGE pode avaliar amostras isoladas em um mesma localidade, ou durante um certo período e determinar se são indistinguíveis ou proximamente relacionadas, sem que exista uma vinculação epidemiológica evidente. Presume-se que tais amostras possuem uma fonte comum, porém distante temporalmente, levando a eventos genéticos isolados. Essas informações são úteis para entender e controlar a disseminação da doença (TENOVER et al. 1995).

Amostras de *C. ulcerans* foram avaliadas em alguns estudos e demonstraram variabilidade de perfis. No estudo realizado em duas amostras isoladas no Japão em 2010, por Komyia e colaboradores (2010), foi possível observar o mesmo pulsotipo para ambas, porém em outro estudo realizado em 45 amostras, 39 eram do mesmo pulsotipo (KATSUKAWA et al, 2012).

1.9 JUSTIFICATIVA

A saúde humana e animal sempre estiveram interligadas. No entanto, os processos sociais e agropecuários ocorridos nos últimos anos proporcionaram um contato maior entre a população humana e os animais domésticos. Esse contato facilitou a disseminação de agentes infecciosos para novos hospedeiros e ambientes, implicando em doenças emergentes de interesse nacional ou internacional (BRASIL, 2010a).

A Vigilância Sanitária abrange ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos e agravos à saúde do indivíduo e da coletividade, além de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, produção e circulação de bens da produção ao consumo e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde. Portanto, tem por objetivo promover e proteger a saúde e prevenir a doença por meio de estratégias e ações de educação e fiscalização (BRASIL, 1990).

Um aspecto inovador para as ações atuais de VISA é a utilização **do princípio da precaução**. Muitas vezes o risco pode ser avaliado como possibilidade, sem que haja, de fato, dados quantitativos, mas sim indícios, baseados na racionalidade e nos conhecimentos científicos disponíveis (BRASIL, 2007). A aplicação do princípio da precaução em seu conceito mais amplo, abrangendo o próprio ser humano, permite invocá-lo em casos de ameaça à saúde humana (CEZAR; ABRANTES, 2003). Segundo Dallari e Ventura (2002), aplica-lo em ações de Vigilância Sanitária é exigência de um comportamento prudente, no que tange a riscos sanitários.

Sob esta ótica, é necessário avaliar com cautela todos os possíveis casos de zoonoses emergentes, uma vez que podem se tornar um grande agravo para à saúde humana, devido à morbidade e mortalidade apresentadas por determinadas doenças, principalmente em situações onde não se verifica um número de casos significativos. O estudo epidemiológico e o aprimoramento dos sistemas de vigilância das doenças são de extrema importância para se conhecer, intervir e recomendar ações que visem seu controle; para tanto é necessário conhecer os diferentes componentes da cadeia de transmissão, assim como os seus fatores de risco (BRASIL, 2010a).

Os dados apresentados anteriormente enfatizam a negligência na pesquisa de microrganismos emergentes (ME) ou re-emergentes (MRE) no Brasil. Os ME permanecem desconsiderados na cadeia de identificação pela falta de conhecimento dos profissionais já que, geralmente, são pouco associados à alta morbidade/mortalidade em humanos no Brasil

ou mesmo no mundo. Os MRE podem, além disso, ter perfis de virulência alterados, com novas “ferramentas” que possibilitem a colonização e a invasão. Não podemos esquecer que todas essas modificações podem estar associadas à vacinação frente à principal espécie do grupo primeiramente envolvida em causar doença, deslocando o perfil de espécies causadoras de doença, além dos casos incidentes sobre os indivíduos imuno-incompetentes ou aqueles que não possuem cobertura vacinal adequada (adultos) (MATTOS-GUARALDI et al, 2003, SOARES et al, 2011). Neste sentido, o número de casos de infecções por microrganismos potencialmente produtores de TD vem aumentando e sua presença em humanos ainda é negligenciada, tanto pela falta de informação por parte dos profissionais de saúde, como pela carência de uma rotina de diagnóstico para estes patógenos (DIAS et al, 2010).

C. ulcerans vem se tornando uma preocupação no âmbito da Saúde Pública pelo potencial zoonótico. O número crescente de casos ocorridos nos últimos cinco anos de *C. ulcerans* em cães e gatos realça sua importância como zoonose emergente, trazendo essa ameaça dos meios rurais para os centros urbanos. A emergência de infecção humana por *C. ulcerans* em áreas urbanas brasileiras foi recentemente documentada (MATTOS-GUARALDI et al, 2008). Em vista disso, em agosto de 2010, o Ministério da Saúde emitiu uma nota técnica (25000.140.269/2010-39) alertando sobre a situação da difteria no Brasil, enfatizando a mudança na faixa etária, ausência de pseudomembranas e a possibilidade da difteria zoonótica e da circulação de *C. ulcerans* e de *C. diphtheriae* no meio da população humana e animal. Embora ainda não tenham sido documentados casos de infecção humana pelo *C. pseudotuberculosis* no Brasil, este patógeno endêmico é causador de infecções em animais de produção (ovinos e caprinos), acarretando importantes perdas econômicas (PACHECO et al, 2007, BAIRD; FONTAINE, 2007, SHARPE et al, 2010, PAVAN et al, 2011). Entretanto, face à mudança que vem ocorrendo no perfil epidemiológico da difteria, com a ocorrência de quadros clássicos causados pelo *C. ulcerans* (WAGNER et al, 2010; TIWARI et al, 2008) e dada a alta similaridade entre seus genomas (TROST et al, 2011), a ocorrência de *C. pseudotuberculosis* não deve ser negligenciada.

Uma vez que a vacina protege apenas contra a ação de TD, os programas de imunizações não impedem a circulação de cepas endêmicas e epidêmicas de *C. diphtheriae*, tampouco de *C. ulcerans*. Portanto, a comunidade envolvida nos sistemas de vigilância deve permanecer atenta para as modificações na epidemiologia da doença e na virulência dos patógenos, inclusive na ocorrência de mutações naturais nas regiões que codificam as subunidades A e B da TD ou mesmo na possibilidade de produção de tipos diferentes de toxinas como ocorre para as amostras de *C. ulcerans* que além de PLD, podem produzir

toxinas com homologia com TD ou com a toxina *Shiga-like*. Neste sentido, análises genômicas e proteômicas das espécies de corinebactérias potencialmente produtoras de TD (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*) têm sido objeto de estudo. É importante ressaltar que o diagnóstico laboratorial deve ser realizado em todas as circunstâncias, em virtude do seu papel determinante na vigilância epidemiológica da doença.

Devido à ocorrência de epidemias em diversos países, a análise do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos tornou-se uma importante ferramenta na caracterização das infecções causadas pelas corinebactérias, uma vez que a antibioticoterapia mostrou-se capaz de limitar a produção da toxina e erradicar o microrganismo do indivíduo contaminado, bem como diminuir o risco de transmissão da doença. A análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos é procedimento indispensável no processo de prevenção e controle de dispersão de amostras resistentes e permite relacionar microrganismos em função da semelhança entre perfis. Considerando as inúmeras variáveis envolvidas no processo de infecção por corinebactérias, a antibiotipagem deve ser sempre associada a, no mínimo, mais uma técnica de tipagem fenotípica e/ou genotípica. Os métodos moleculares associados aos métodos fenotípicos clássicos favoreceram os estudos da caracterização de microrganismos para fins taxonômicos, diagnósticos e epidemiológicos.

Além disso, diferenças quanto à capacidade de colonização e infecção das diversas corinebactérias podem ser relacionadas à prevalência de cepas epidêmicas, invasoras e/ou de alguns biótipos sobre os demais (MATTOS-GUARALDI et al, 2003). Embora as corinebactérias sejam consideradas colonizadoras extracelulares, a já demonstrada capacidade de sobrevivência no interior de células respiratórias poderia ajudar a explicar a permanência da infecção no trato respiratório, apesar da terapia antimicrobiana e administração de antitoxina diftérica (HIRATA JR et al, 2004). A identificação de mecanismos de interação deste microrganismo poderá, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento das infecções causadas por esta espécie. Ligantes expressos na superfície de corinebactérias podem representar alvos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, vacinas ou bloqueadores de aderência e/ou invasão (SABBADINI et al, 2010).

2 OBJETIVOS

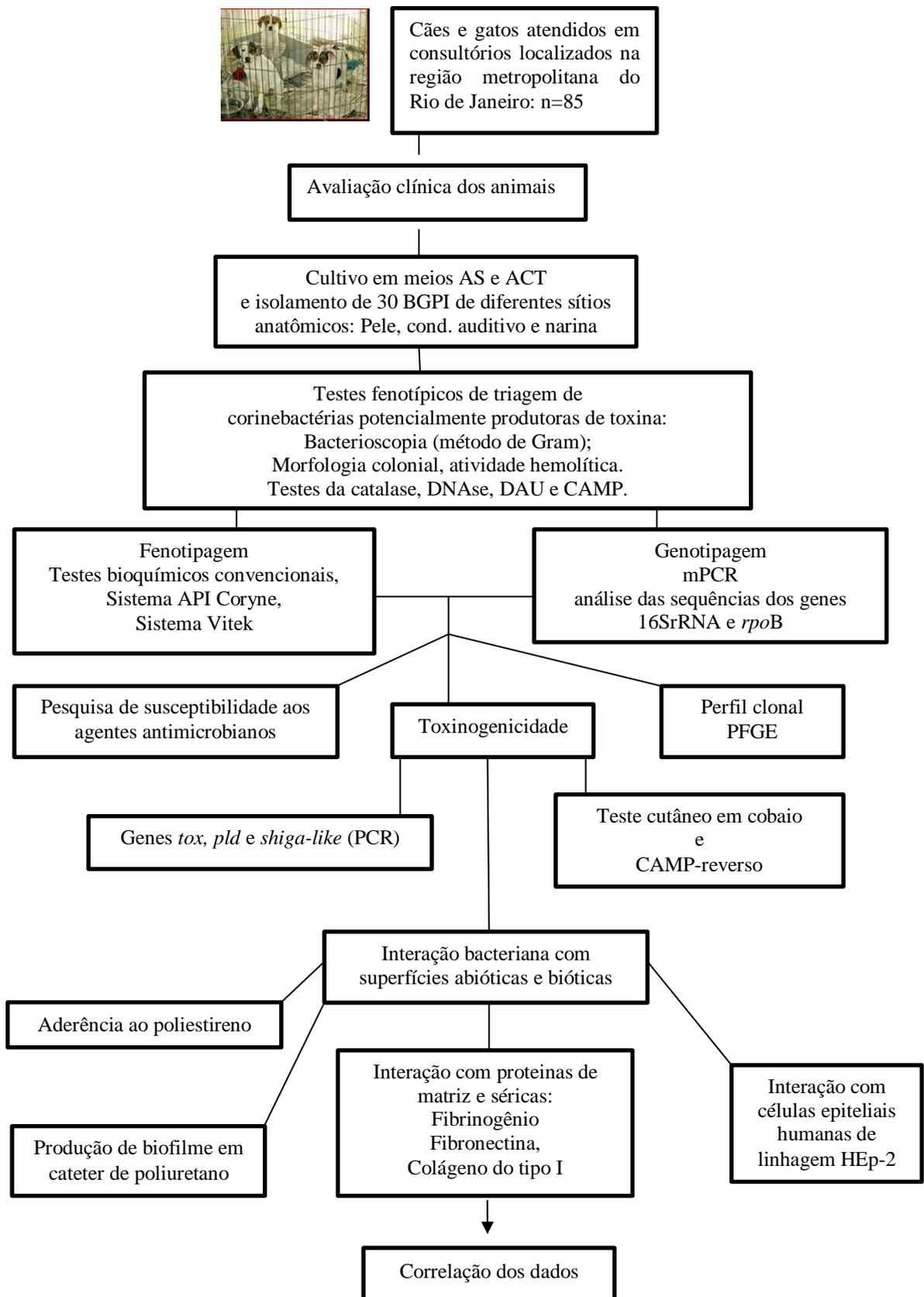
O projeto teve como objetivo geral o isolamento, a caracterização e a verificação do potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium ulcerans* oriundas de animais domésticos domiciliados na área metropolitana do Rio de Janeiro.

Neste sentido, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- Isolamento de amostras de bastonetes Gram-positivos irregulares obtidos de processos de infecção e/ou colonização em caninos e felinos domiciliados em residências na região metropolitana do Rio de Janeiro;
- Avaliação da ocorrência de diferentes espécies do gênero *Corynebacterium*;
- Identificação de espécies potencialmente produtoras de Toxina Diftérica (TD) através de testes bioquímicos convencionais, sistemas automatizados (API e VITEK) e técnicas moleculares;
- Cofirmação da espécie análise das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*;
- Pesquisa de potencial toxinogênico dos microrganismos através de métodos fenotípicos e genotípicos;
- Análise de perfis de susceptibilidade a diversos agentes antimicrobianos;
- Avaliação do relacionamento clonal de amostras de *C. ulcerans* de origens diversas pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE);
- Pesquisa da capacidade de interação bacteriana com superfície abiótica e hidrofóbica de poliestireno, inclusive com cateter de poliuretano;
- Pesquisa da capacidade de interação bacteriana com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular (Fbg, Fn e colágeno do tipo I) de humanos;
- Análise quantitativa e qualitativa da cinética de aderência e viabilidade intracelular de amostras de *C. ulcerans* com células epiteliais humanas de linhagem HEp-2;
- Correlacionar o potencial zoonótico com as diversas características fenotípicas e genotípicas dos microrganismos isolados no estudo.

3 METODOLOGIA

3.1 FLUXOGRAMA DE EXPERIMENTOS



3.2 ORIGEM DAS AMOSTRAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Com base nos princípios da Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), o presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), tendo sido protocolado sob licença nº P-0462/08 e LW-64/12.

Foram avaliados 85 animais de ambos os sexos, com idades e raças variadas, provenientes de diferentes regiões da área metropolitana do Rio de Janeiro: Imbariê (distrito de Duque de Caxias), e Vital Brazil, Niterói, em colaboração com o Hospital Universitário de Medicina Veterinária Prof. Firmino Mársico Filho (HUVET) da Universidade Federal Fluminense (UFF), no ano de 2012. Os cães e gatos passaram por uma avaliação geral da condição clínica e do estado nutricional, conforme descrito no *Canadian Council on Animal Care* (CCAC, 2013), para verificar a presença de quaisquer infecções ou doenças debilitantes, incluindo dermatoses e outras anormalidades óbvias físicas ou de comportamento. A coleta foi realizada com simples contenção manual, sem uso de anestésicos ou tranquilização, evitando-se assim quadro de estresse.

As amostras clínicas *C. ulcerans* 809 (*Shiga-like* positiva e *tox* - isolada de humano) e BR-AD22 (*tox* - de canino portador assintomático), a amostra padrão CDC KC279 (*tox* + animal); além das amostras de *C. diphtheriae* ATCC 27010 (*tox* -) e ATCC 27012 (*tox* +) e 1002 de *C. pseudotuberculosis* (**Tabela 2**) foram adicionalmente incluídas neste trabalho, como amostras-controle e se encontravam estocadas no Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica (LDCIC) da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM/UERJ), em *skim milk* a – 70° C.

Tabela 2

Origem e características biológicas das amostras de *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* usadas como controle.

Número da Amostra/País	Subespécie	Sítio de Isolamento	Quadro Clínico	Urease/ DNase	Toxinogenicidade		
					Gene ¹ <i>tox</i>	Fosfolipase D (PLD) ²	Shiga-like
<i>C. ulcerans</i>							
CDC KC 279/EUA	-	Pulmão	Pneumonia	+/+	+	+	-
809/2000/Brasil	-	Pulmão	Pneumonia	+/+	-	+	+
BR-AD22/Brasil	-	Narina	Assintomático	+/+	-	+	-
<i>C. diphtheriae</i>							
ATCC 27010/ EUA	mitis	Faringe	Faringite	-/+	-	-	
ATCC 27012/EUA	mitis	Faringe	Faringite	-/+	+	-	
<i>C. pseudotuberculosis</i>							
1002/ Brasil	ovis	Linfonodo	Abscesso	+/-	-	+	-

ATCC: American Type Cell Collection ¹ Técnica de PCR utilizando iniciadores preconizados por Nakao; Popovic (1997), ² Reação de CAMP-reverso. Fonte: Dias et al (2011).

3.3 ISOLAMENTO, CULTIVO E ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

A identificação das amostras de *C. ulcerans* foi realizada usando-se métodos fenotípicos e genotípicos no LDCIC da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da FCM/UERJ.

O material coletado a partir de mucosa nasal, pavilhão auricular, além de lesões dérmicas de caninos e felinos de raças e idades diversas, clinicamente saudáveis, domiciliados ou residentes em abrigos localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro, foi obtido de forma asséptica, com uso de swabs em meio de transporte de Stuart. O material coletado foi semeado em placas de ágar-sangue (AS) e ágar-chocolate-telurito (ACT), que foram incubadas a 35-37°C por 48h como descrito por Dias e colaboradores (2011b). O estoque das culturas em *skim milk* a 10% com 25% de glicerol foi mantido a -70°C, sendo esses reativados

quando necessário em *Trypticase Soy Agar* (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) a 37°C por 24 h sob condições aeróbicas (DIAS et al, 2010).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *C. ulcerans*

3.4.1 Testes bioquímicos convencionais

Culturas bacterianas positivas para bacilos irregulares Gram-positivos foram preliminarmente caracterizadas pela morfologia e pigmentação das colônias. As provas bioquímicas de triagem incluíram os testes da catalase, atividade DNase, duplo-açúcar – glicose e maltose - e ureia (DAU) e o teste de CAMP (inibição da hemólise pelo *Staphylococcus aureus*) (PIMENTA et al, 2008, MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009, DIAS et al, 2010).

Posteriormente as amostras foram submetidas aos testes de redução de nitrato, King B, esculina e fermentação de açúcares: sacarose, galactose, arabinose, manitol, xilose, ribose, glicose, manose, maltose, frutose e trealose.

3.4.2 Sistema semi-automatizado API-Coryne System V3.0

Suspensões de colônias obtidas em meio TSA a 37°C por 24h foram preparadas com o meio de dispersão disponível no kit do teste API-Coryne (bioMérieux, Lyon, France) correspondendo a turvação de 6 da escala de McFarland. As seguintes provas bioquímicas foram lidas no cartão: nitrato, pirazinamidase, pirrolidonil-arilamidase, fosfatase alcalina, β -glucoronidase, β -galactosidase α -glucosidase, N-acetil- β -glucosaminidase, esculina, urease, gelatinase, glicose, ribose, xilose, manose, maltose, lactose, sacarose, glicogênio e catalase (EFSTRATIOU; GEORGE, 1999, PIMENTA et al, 2008, DIAS et al, 2010). Depois de preencher os poços até esculina, o restante da suspensão foi adicionada ao meio GP,

disponibilizado no kit, sendo a suspensão resultante utilizada para preencher o restante dos poços. Os poços para fermentação dos açúcares foram selados com parafina; a galeria foi colocada em estufa por 24h e a leitura foi feita com o sistema de códigos API web (www.apweb.biomerieux.com).

3.4.3 Sistema automatizado VITEK

As amostras de *C. ulcerans* foram testadas pelo sistema VITEK 2 (nº sistema VK2C7494), sendo utilizado o cartão ANC (*Anaerobe and Corynebacterium* – lote nº 244234910) para identificação, incluindo os seguintes testes: D-galactose, leucina arilamidase, Ellman - DNTB (ácido ditionitrobenzoico), fenilalanina-arilamidase, L-prolina-D- arilamidase, L-pirrolidonil-arilamidase, D-celobiose, tirosina-arilamidase, ala-phe-pro-arilamidase, D-glicose, D-manose, D-maltose, sacarose, arbutina, N-acetil-D-glucosamina, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-B-glucoside, urease, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-B-glucoronide, beta-galactopiranosidase indoxil, alfa-arabinosidase, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-galactoside, Beta-manosidase, arginina di-hidrolase, utilização do piruvato, maltotriose, hidrólise da esculina, beta-D- fucosidase, fenil-fosfonato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-N-acetil-glicose, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-manoside, alfa-L-fucosidase, fosfatase, alfa-L-arabinofuranosidas, fermentação de: l-arabinose, D- ribose 2 e D-xilose.

Segundo orientação do fabricante (www.biomérieux-usa.com), no cassete com os tubos VITEK foram adicionados 3 mL de solução salina 0,45% do VITEK para preparação do inóculo, antes do preparo o *Densichec Plus* (fotocolorímetro) foi calibrado utilizando a solução salina pura e as escalas de McFarland (0, 0,5, 2, 3). As amostras foram cultivadas em TSA e incubadas a 37°C por 24 horas. Uma suspensão homogênea foi preparada a partir dessa cultura e a turvação ajustada a 2,7-3,3 da escala de McFarland pelo *Densichec Plus*. Os cartões foram abertos e colocados no cassete, de forma que o canudo do cartão ficasse dentro do inóculo. O cassete foi então levado a câmara de vácuo no aparelho VITEK 2. Posteriormente, o cassete foi transferido para a segunda câmara para leitura. Após a leitura do código de barras dos cartões, esses foram identificados no computador. Os resultados foram obtidos após 5-6 horas.

3.4.4 Reação em cadeia da polimerase - multiplex (mPCR)

A identificação molecular das amostras foi realizada por uma mPCR que proporcionou simultaneamente a identificação e a detecção da toxigenicidade de espécies de *Corynebacterium* com potencial zoonótico (TORRES et al, 2013). O DNA bacteriano foi extraído por fervura (10 minutos a 100°C) de uma alçada de colônia em 1 mL de H₂O miliQ estéril e posterior resfriamento a 0°C. A suspensão foi centrifugada a 13.000 g por 2 minutos e 2µL do sobrenadante (DNA) foi empregado na reação (PIMENTA et al, 2008).

O protocolo do mPCR utilizado foi baseado em experimentos prévios (PACHECO et al, 2007, TORRES et al, 2013) com os seguintes reagentes: 2,5 µL solução tampão (Accuprime-Invitrogen); 2,5 µL de Taq polimerase 1,5 UI (Accuprime); 0,75 µL Cloreto de Magnésio (MgCl); 0,5 µL deoxinucleotídeos (dNTP); H₂O miliQ q.s.p para um total de 23 µL da mistura de reação; foi empregado o valor de 1 µL de cada iniciador. Cinco pares de iniciadores (Gibco-BRL) foram empregados no mPCR, compostos das sequências nucleotídicas apresentadas na **Tabela 3**.

O programa de amplificação foi realizado num termociclador (MyCycler TM - thermal cycler Bio-Rad, EUA) e constituiu-se em uma de etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento à temperatura de 55°C por 40 segundos e para extensão à temperatura foi de 72°C pelos intervalo de 1,5 minutos. A extensão final foi realizada à temperatura de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram revelados através da técnica de eletroforese em gel de agarose 1,2% (E-Gel[®]-Invitrogen) e adição de brometo de etídeo. O DNA ladder (Invitrogen) foi usado como padrão de peso molecular. As bandas foram visualizadas em transiluminador (E-Gel[®] Imager UV Light Base-Life Technologies[™]) conforme descrito por Pallen e colaboradores (1994) e Nakao e colaboradores (1996).

Tabela 3

Multiplex PCR para identificação simultânea de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* e detecção da produção de toxina.

Iniciadores	Tamanho molecular	Função na Reação de PCR
16S rRNA: região do RNA ribossomal <i>16S-F</i> ACCGCACTTTAGTGTGTGTG <i>16S-R</i> TCTCTACGCCGATCTTGTAT	816 pb	Confirma o isolado clínico ou a cepa referência como <i>C. ulcerans</i> ou <i>C. pseudotuberculosis</i> (PACHECO et al, 2007)
<i>rpoB</i> C2700F CGTATGAACATCGGCCAGGT C3130R TCCATTTGCGCCGAAGCGCTG	446 pb	Confirma a identidade do isolado ou cepa de referência como <i>Corynebacterium sp.</i> (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004).
<i>Diphth 4:</i> <i>Diphth 4F</i> GAACAGGCGAAAGCGTTAAGC <i>Diphth 4R</i> TGCCGTTTGATGAAATTCTTC	303 pb	Confirma a presença do gen <i>tox</i> entre as regiões correspondentes aos fragmentos A e B da toxina diftérica (NAKAO et al, 1996)
<i>dtxR</i> <i>dtxR 1F</i> GGGACTACAACGCAACAAGAA <i>dtxR 1R</i> CAACGGTTTGGCTAACTGTA	258 pb	Confirma o isolado clínico ou cepa de referência como <i>C. diphtheriae</i> (PIMENTA et al, 2008)
<i>pld</i> <i>pld F</i> ATAGCGTAAGCAGGGAGCA <i>pld R</i> ATCAGCGGTGATTGTCTTCC	204pb	Confirma o isolado como <i>C. pseudotuberculosis</i> (PIMENTA et al, 2008)
<i>Shiga-like (rpb)</i> Shiga F ATGCGTCTGCTGACGACCCG Shiga R ACCGCGTTACCTTCGCTTGTC	214 pb	Confirma presença de toxina <i>Shiga-like</i> (TROST et al, 2011)

3.4.5 Sequenciamento gênico após amplificação dos genes *rpoB* e 16s rRNA

As amostras bacterianas foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo *brain-heart-infusion* (BHI) e incubados a 37°C por 24/48 horas. Alíquotas de 2 mL de cultura de cada isolado foram transferidas para um microtubo e centrifugados a 3.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 500 µl de água mili-Q esterilizada e submetido a banho-maria fervente (100°C) por 15 min. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. Este material foi posteriormente descongelado e centrifugado (14.000 g por 15 seg) e o sobrenadante transferido para outro microtubo e utilizado na reação da PCR (WATTS et al, 2000).

Para amplificação de regiões específicas do genoma das amostras, a reação da PCR foi realizada em um volume final de 50 µl. As reações individuais foram compostas de água esterilizada, tampão de reação 1x (Eppendorf), 3 mM de MgCl₂ (Eppendorf), 10 mM de cada dNTP (dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]/Eppendorf), 150 ng de cada iniciador, 1,5 UI da enzima *Taq* polimerase (Eppendorf) e 3 µl do DNA obtido pela extração por choque térmico, como descrito anteriormente. A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72°C por 2 min e uma etapa final de extensão a 72°C por 7 min. Dois pares de iniciadores foram usados neste estudo, para amplificação do gene 16S rRNA, os iniciadores universais pA e pH, sendo os iniciadores 1831 com 1832 usados para a reação do sequenciamento (WATTS et al, 2000). A amplificação e sequenciamento do gene *rpoB* foi realizada conforme descrito por Khamis, Raoult e La Scola (2004).

Após a amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x. O tampão de corrida foi adicionado nas amostras de DNA (1/5 do volume da solução de DNA). Foram aplicados 7 µl do produto da PCR e 1µl de marcador de peso molecular nos poços do gel e a eletroforese realizada em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 60 volts por 60 min. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio (5 mg/mL) e observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com o equipamento VDS (Pharmacia-Biotech).

3.4.5.1 Determinação das sequências nucleotídicas

Esta etapa de pesquisa foi realizada no Setor de Identificação Bacteriana do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz, em colaboração com a Prof^a Dra. Verônica V. Vieira.

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados (Invitrogen – PureLink PCR purification Kit) e utilizados como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) conforme as recomendações dos fabricantes. Posteriormente os produtos desta reação foram precipitados com 80 µL de uma solução com 75% de isopropanol, centrifugados por 45 min a 4.000 g a 21°C e o sobrenadante desprezado pela inversão cuidadosa da placa em papel de filtro. A placa foi invertida em cima de outro papel de filtro, centrifugada por 1 min a 900 g a 21°C e deixada em estufa a 75°C por 5 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 10 µL de formamida, centrifugados por 1 min a 900 g a 21°C, incubados por 5 min a 95°C e resfriados imediatamente em banho de gelo. Após a corrida no sequenciador (ABI PRISM 3100 Applied Biosystems DNA Sequencer), as sequências nucleotídicas foram analisadas, editadas utilizando o programa SeqMan versão 7.0 (DNASTAR *Lasergene*) e comparadas àquelas depositadas no banco de sequências GenBank e Ribosomal Database Project II (RDP-II). Posteriormente foram também depositadas no GenBank.

3.5 PESQUISA DE POTENCIAL TOXINOGENICO DOS MICRORGANISMOS ATRAVÉS DE MÉTODOS GENOTÍPICOS E FENOTÍPICOS

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase- multiplex (mPCR) para a pesquisa do gene *tox*

A presença do gene *tox* foi avaliada simultaneamente à identificação molecular das amostras no mPCR, conforme descrito no item 3.4.4, através de amplificação do gene com os iniciadores *diph4*.

3.5.2 Pesquisa de toxina *Shiga-like* (gene *rpb*)

A pesquisa do gene *rpb* foi realizada pela PCR, com o seguinte protocolo: 2,5µL de tampão PCR 10x (Invitrogen), 0,75µL de MgCl₂ (Gibco-BRL), 1µL de cada oligonucleotídeo iniciador (shiga-like F: e shiga like R:) a 100µM, 0,5µL de dNTP (Gibco-BRL) a 10mM, 2,5 µL de Taq-polimerase a 1,25UI (Gibco-BRL), 2µL da preparação de DNA molde e água Mili-Q para completar um volume final de 25 µL. A etapa de amplificação genômica foi realizada em termociclador (MyCycler TM), da seguinte forma: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos das etapas de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 62°C por 1min e extensão a 72°C por 1min e 30 seg; etapa final de extensão a 72 °C por 10min (SANTOS et al, 2009).

3.5.3 Teste de CAMP

Em placa de ágar sangue (5% sangue de carneiro) foi semeado *Staphylococcus aureus* coagulase positivo em linha. As amostras foram semeadas em linhas perpendiculares, sem tocar a linha do *S. aureus*. A placa foi colocada em estufa a 37°C e a leitura em 24h e 48h, observando-se a inibição do halo de hemólise formado pelo *S. aureus* (inibição da β-hemolisina pela fosfolipase D (PLD)), o que caracteriza uma reação de CAMP-reverso (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

3.5.4 Avaliação do potencial toxinogênico *in vivo*

Baseado em metodologia descrita em Dias e colaboradores (2011b), cobaios (*Cavea porcellus*), machos e fêmeas, pesando 500 g +/- 10%, provenientes do Centro de Criação Animal (CECAL/Fiocruz), receberam injeções subcutâneas de suspensões bacterianas, para avaliar o potencial toxinogênico e formação de lesões cutâneas (úlceras e formação de

fibrina). O inóculo bacteriano foi preparado em tampão salina fosfato (PBS), na densidade óptica (D.O) de 0,2 a 580nm de absorbância. As cobaias receberam uma única injeção e foram observadas e avaliação quanto a formação de úlcera por um período de 7 dias.

3.6 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A susceptibilidade aos antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, UK), penicilina G (10 U), ampicilina (10 µg), cefotaxime (30 µg), imipenem (10 µg), erithomcina (15 µg), clindamicina (2 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg), linezolida (30 µg) and vancomicina (30 µg) foi determinada pelo método de disco difusão usando inóculo equivalente ao padrão 0.5 McFarland, de acordo ao previamente adotado por outros autores (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; ORTEGA; SUAREZ, 1995, CLSI, 2013, DIAS et al, 2010).

Placas contendo ágar Mueller-Hinton com 5% sangue de carneiro foram semeadas, os discos foram distribuidos e as leituras realizadas em 24 h e reconfirmadas a 48 h, em incubação a 37°C. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios preconizados pelo Clinical and Laboratory Standarts Institute (2013) para outros microrganismos que não sejam *Haemophilus sp.* e *Neisseria gonorrhoeae*, utilizando para os halos de penicilina G e ampicilina diâmetros estabelecidos para *Staphylococcus aureus*. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) de penicilina G e clindamicina foi também avaliada pelo E-test® (Probac, AB Biodisk, Solna, Suécia), como previamente descrito (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; ORTEGA; SUAREZ, 1995, PEREIRA et al, 2008).

3.7 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CLONES ATRAVÉS DE PFGE

O DNA genômico foi preparado seguindo método descrito previamente (BAIO et al, 2013). As bactérias foram crescidas em TSA e incubadas por 24h a 37°C. Em um tubo contendo salina 0,85% foi feita uma suspensão a com turvação equivalente ao da escala 2 de

McFarland a partir da cultura bacteriana em TSB. Foram transferidos 2 mL dessa suspensão bacteriana para outro tubo, que foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao *pellet* 200 μ L do tampão PIV e 200 μ L de agarose low-melting a 2 % (NuSieve[®] GTG[®] agarose, BioWhittaker Molecular Applications). A solução foi homogeneizada cuidadosamente com ponteira, e o líquido foi dispensado no interior de um canudo estéril. Após deixar os canudos 5 minutos na geladeira, com auxílio de um swab e bisturi estéreis, os blocos de agarose foram cortados e colocados em um tubo com 2 mL de solução de lise (1M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.25M EDTA e 1 mg/mL de lisozima (Sigma, St. Louis, MO)). Esses blocos foram incubados a 37°C por 24h. Após esse período, a solução de lise foi retirada e foram adicionados 2 mL da solução contendo EDTA, Sarcosina 1% e proteinase K 1 mg/mL. Os tubos foram incubados durante uma noite a 50°C.

Em novos tubos contendo 4 mL de TE 1x foram adicionados 4 blocos contendo DNA genômico. Os tubos contendo o restante dos blocos foram guardados na geladeira. Os blocos selecionados foram lavados com TE 1x duas vezes por dia durante três dias consecutivos. Após a etapa de lavagem, retirou-se o TE e foi adicionada uma solução de tampão pré-SfiI (50 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9), durante 40 minutos à temperatura ambiente. Esse tampão foi retirado e substituído por 50 μ L do mesmo tampão contendo 20 U (1 μ L) da enzima SfiI; os tubos foram incubados a 50 °C durante 18 a 24 horas. Preparou-se 2,5 L de TBE 0,5x. O gel de agarose a 1,2% foi preparado utilizando TBE 0.5x e 1,2 g de agarose. Após o período de incubação, a solução contendo a enzima foi retirada e os tubos colocados no *heatblock* a 68,5°C para inativar a enzima e derreter a agarose para aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada no sistema CHEF DRII (Bio-Rad). Os tempos de pulso foram 1-30 s por 20 h. Um concâmetro lambda DNA (New England BioLabs) foi usado como marcador de tamanho molecular. Semelhanças entre padrões de restrição foram identificadas de acordo com critérios estabelecidos por Tenover e colaboradores (1995). O software BioNumerics Fingerprinting (Versão 4.0, Applied Math, Sint-Martins-Latem, Belgium) foi utilizado para confirmar os achados encontrados na análise visual. O índice de similaridade das amostras foi calculado usando o coeficiente de correlação Dice com uma tolerância de 1% na posição das bandas e o método de agrupamento (UPGMA) foi usado para construir um dendrograma. Amostras foram consideradas pertencentes ao mesmo grupo pelo PFGE se o índice de similaridade encontrado foi \geq 85% dos coeficientes de similaridade.

3.8 INTERAÇÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATOS ABIÓTICOS

3.8.1 Avaliação de interação bacteriana com superfície abióticas hidrofóbicas em microplacas de poliestireno

As amostras foram cultivadas em placa contendo TSA por 24/48h a 37°C. Depois foi feita uma suspensão em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*) com DO de 0,2 a 580 nm, equivalente a 10^8 UFC/mL. Os poços da microplaca de poliestireno de fundo reto foram preenchidos com 200 µL de cada suspensão, sendo alguns poços preenchidos com TSB puro para controle negativo. A microplaca foi incubada a 24/48h a 37°C, e depois retirado o sobrenadante. Os poços foram lavados suavemente com 200 µL de solução salina e corados com 200 µL de cristal violeta a 2% por 5 minutos. A placa foi então lavada 4 vezes com água destilada. Para solubilização do corante foram adicionados 160 µL de ácido acético glacial a 33% e a leitura foi realizada em leitor de Elisa com filtro único a 570 nm.

As amostras foram classificadas em quatro categorias: não aderente (0) = quando a DO obtida foi menor que a DO do controle negativo (DO_c); fracamente aderente (+) = $DO_c < DO \leq 2x DO_c$; moderadamente aderente (++) = $2x DO_c < DO \leq 4x DO_c$ e fortemente aderente (+++) = $4x DO_c \leq DO$ (STEPANOVIC et al, 2000, GOMES et al, 2009).

3.8.2 Pesquisa da capacidade de produção de biofilme em cateter de poliuretano pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Pequenos segmentos de 1 cm de cateter de poliuretano (Intracath) estéreis foram imersos em tubos contendo uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a 10^6 UFC/mL e incubados por 24h a 37°C em aerobiose.

Após o período de incubação, o fragmento de cateter foi lavado duas vezes com 1 mL de salina estéril. O material foi então fixado em solução de glutaraldeído a 2,5%, pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% e desidratado em diferentes soluções de etanol. Em seguida, o material foi submetido ao ponto crítico com dióxido de carbono, coberto com nanopartículas de ouro e examinado em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310, por meio da colaboração do Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra (UEZO). O controle negativo foi realizado com segmentos de cateter de poliuretano estéreis, os quais também foram processados diretamente após a remoção da embalagem comercial (GOMES et al, 2009).

3.9 INTERAÇÃO BACTERIANA COM PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E DE MATRIZ EXTRACELULAR HUMANOS

Testes de ligação bacteriana usando Fibrinogênio (Fbg), Fibronectina (Fn) e colágeno Tipo I biotinizados (Sigma Chemical Co.) foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços (Corning, NY, USA). Culturas bacterianas crescidas em caldo TSB por 24 h a 37°C foram lavadas 2x com PBS, e ressuspensas em 0,1M NaHCO₃, pH 9,6 a uma suspensão equivalente a 5×10^9 UFC/mL (DO 0,2 a $\lambda = 650$ nm). Os poços foram sensibilizados com 100 μ L de suspensão bacteriana por 1 h a 37°C, e por uma noite a 8°C. Uma curva padrão foi construída utilizando a diluição de soluções de proteínas biotinizadas em concentrações variando de 5 a 0.05 μ g (1h/37°C). Após bloqueio com 2% soro albumina bovina (BSA tipo V, Sigma) em PBS acrescida com 0.05% Tween-20 (PBST) por 1 h a 37°C, os poços foram lavados 3x com PBST. As amostras bacterianas reagiram com 20 μ g/mL de proteínas biotinizadas de ECM/plasma por 1h a 37°C. Depois de lavagem por 3x com PBST, foi adicionada aos poços Extravidina-peroxidase (Sigma) 0.001 μ g/mL preparada em PBST 1% BSA por 30 min a 37°C. Após nova lavagem com PBST (3x), a reação foi verificada pela adição de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma) por 20 min e a reação bloqueada com 50 μ L de HCl 1M. A leitura da reação foi realizada a $\lambda = 450$ nm em leitor de placa de microtitulação. A intensidade da cor dos poços sensibilizados com os microrganismos foi comparada à curva padrão pelo GraphPad Prism versão 6.0.

Os resultados foram expressos em microorganismos aderidos às proteínas, com uma média \pm SD de três ensaios independentes realizados em triplicata. As médias das propriedades de ligação foram comparadas pelo teste de Tukey (HARLOW; LANE, 1988, SABBADINI et al, 2010).

3.10 ENSAIOS DE ADERÊNCIA E VIABILIDADE INTRACELULAR BACTERIANA EM CÉLULAS EPITELIAIS HUMANAS DE LINHAGEM HEp2

As amostras bacterianas foram cultivadas em caldo TSB por incubação a 37°C/48 horas, em seguida, as células bacterianas foram lavadas três vezes com PBS-D (*Dulbecco modified phosphorus buffer saline solution*) (pH 7,2, 0,01M) e ressuspensas em DMEM (Sigma) até alcançar a DO 0.1 sob $\lambda = 580\text{nm}$ (10^7 UFC).

Após os períodos de infecção das células HEp2 com a suspensão bacteriana (3h e 6h), alíquotas do meio de cultivo celular foram reservadas para a contagem de bactérias viáveis livres no sobrenadante, em seguida, os tapetes foram lavados 4 vezes com 500 μL de PBS-D para eliminação das bactérias não associadas e de resíduos do meio de cultivo celular, a seguir os tapetes celulares foram lavados e tratados com 500 μL de PBS-D contendo 0,1% de Triton X100 (Biorad Laboratories, Richmond, Ca, EUA) por 30 segundos, para que ocorresse a lise das células. Diluições das alíquotas reservadas e dos lisados celulares foram diluídos e plaqueados em meio TSA, permitindo a contagem de bactérias viáveis associadas ao tapete celular.

Ao final dos intervalos de infecção, alguns poços foram expostos a 500 μL de uma solução de gentamicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 hora, com a finalidade de eliminar bactérias extracelulares aderidas às monocamadas (exclusão pela gentamicina) permitindo a contagem de bactérias internalizadas. As contagens resultaram no número total de bactérias associadas ao tapete (intracelulares + extracelulares) e no número de bactérias ocupando localização intracelular. Os percentuais de aderência e viabilidade intracelular foram calculados a partir das relações entre os números de bactérias associadas e/ou internalizadas com as contagens de bactérias viáveis no sobrenadante somado ao número de células viáveis associadas às monocamadas (HIRATA JR. et al, 2002).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios desse estudo foram realizados em triplicata e os resultados analisados através do teste paramétrico de *Student* e/ou do teste não paramétrico de análise da variância de Tukey.

Para os ensaios de cultura de célula os resultados foram avaliados pelo teste não paramétrico de análise da variância de Tukey.

4 RESULTADOS

4.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Embora tenham sido analisados 72 cães e 13 gatos domiciliados nas regiões de Niterói e Duque de Caxias, (**Tabela 4 e Figura 1**), foi isolado um total de 22 amostras de BGPI de 49 cães domésticos assintomáticos atendidos para procedimentos de rotina (banho/tosa e imunização) em Consultório Veterinário localizado no Distrito de Imbariê, Duque de Caxias/RJ, incluindo duas amostras posteriormente identificadas como *C. ulcerans*, BR-AD41e BR-AD61 (**Tabela 5**). Não foram isoladas amostras de *C. diphtheriae* e de *C. pseudotuberculosis* em nenhum animal avaliado em qualquer uma das localidades. Adicionalmente, não foram isoladas amostras de corinebactérias potencialmente produtoras de toxina em nenhum dos gatos avaliados.

Deste modo, as amostras de *C. ulcerans* foram oriundas da Baixada Fluminense, cujo desenvolvimento socioeconômico permanece precário e com condições higiênico-sanitárias desfavoráveis. Imbariê, apesar de localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro, não está próximo geograficamente às outras duas regiões onde foram anteriormente isoladas as amostras BR-AD22 e 809, de cão de abrigo e de paciente humano, respectivamente (**Figura 2**). A amostra BR-AD22 foi isolada de um cão residente em abrigo no município de Niterói (DIAS et al, 2010), também pertencente a região metropolitana do Rio de Janeiro, porém em condições socioeconômicas e de higiene mais desenvolvidas do que as existentes em Imbariê, sendo considerada a cidade com maior índice de desenvolvimento humano (IDH) do estado do Rio de Janeiro (CEPERJ, 2013). A amostra 809 foi isolada de um paciente humano (MATTOS-GUARALDI et al, 2008) residente na zona sul do Rio de Janeiro, área nobre com qualidade de vida superior e condições socioeconômicas e de higiene favoráveis, sendo quase em sua totalidade urbanizada.

Tabela 4

Número de animais domésticos (cães e gatos) pesquisados e sua distribuição geográfica na região metropolitana do Rio de Janeiro

Animais	Imbariê (consultório)	Niterói -Vital Brazil/(HUVET)	Total
Cães	49	23	72
Gatos	5	8	13
Total	54	31	85

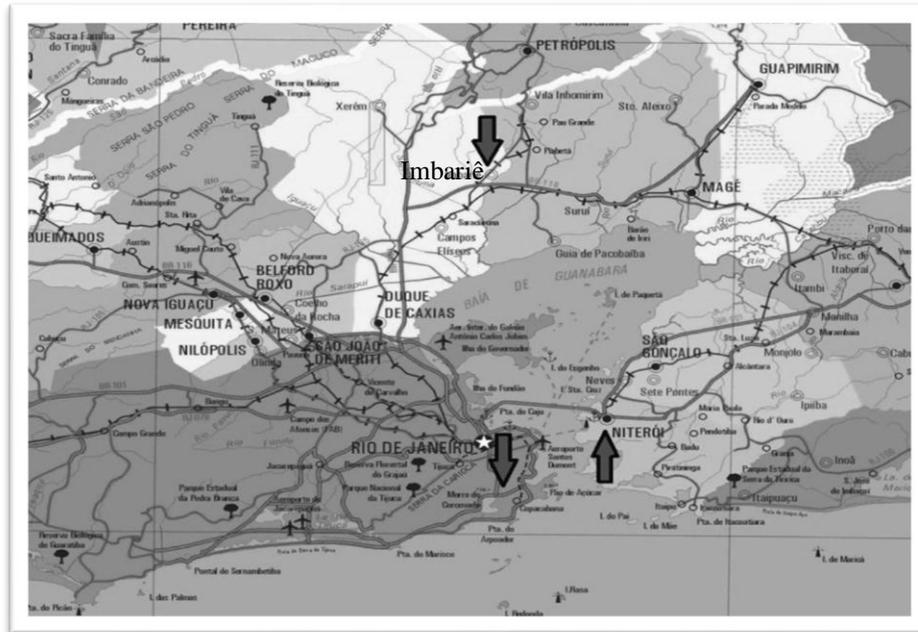
Tabela 5

Número e características das amostras isoladas de BGPI e de *Corynebacterium ulcerans* em cães

Localidade Bairro/ Cidade/Estado/ Ano	Número de amostras isoladas de BGPI(C/G)			<i>C. ulcerans</i>	
	Conduto auditivo	Narina	Lesão de pele	Narina	Lesão de pele
Imbariê/ Duque de Caxias/ RJ/2012	6/1	10/1	1/1	1	1
Vital Brazil/ Niterói/ RJ/2012	1	7	0	0	0
Total	8	18	2	1	1

C:cão; G: gato

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica das amostras de *C. ulcerans* isoladas no presente estudo e em estudos anteriores



Fonte: Adaptado de Google maps

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *C. ulcerans*

Após a seleção de colônias sugestivas de *Corynebacterium*, cultivadas em ágar sangue de carneiro e ágar-chocolate-telurito, e posterior identificação de BGPI em coloração de Gram, as amostras foram avaliadas nos testes de triagem DNase, urease (meio de DAU), CAMP e catalase. Duas amostras foram positivas nos testes de triagem, conforme ilustrado na **Figura 2**. Após a seleção na triagem, as amostras passaram pelos testes bioquímicos convencionais (redução de nitrato, King B e hidrólise da esculina) e fermentação de açúcares. A fermentação da maltose foi fracamente positiva e tardia para ambas as amostras sugestivas de *C. ulcerans* (**Tabela 6**).

Figura 2. Caracterização fenotípica de *C. ulcerans*. A: colônias cinza-escuros em ágar-chocolate-telurito; B: BGPI em coloração de Gram; C: DNase positivo; D: placa de ágar-sangue, mostrando o CAMP-reverso; DAU positivo (atividade urease).

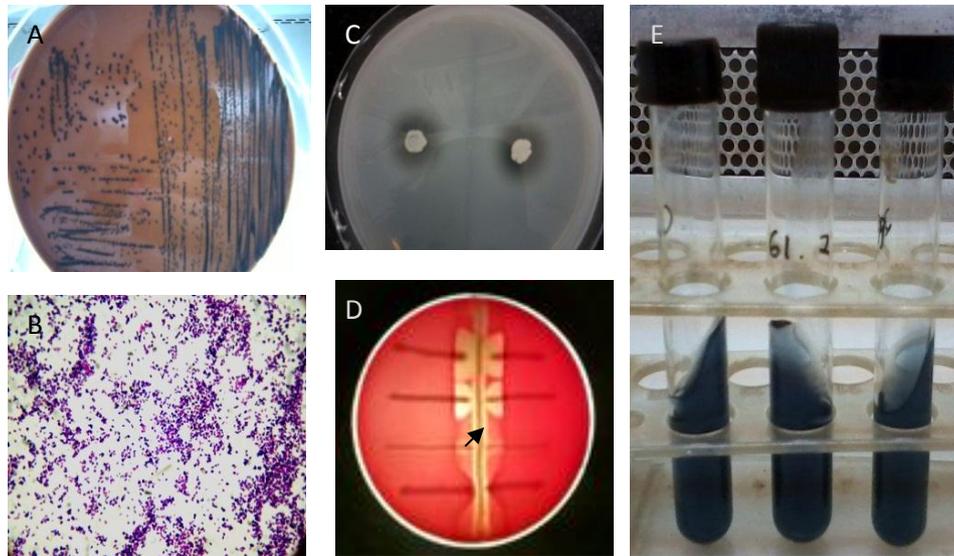


Tabela 6

Resultados esperados nas provas fenotípicas de *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* e *C. diphtheriae*

	Triagem						Fermentação de açúcares										
	Nitrato	Urease	Hidrólise esculina	CAMP	Catalase	DNase	Glicose	Maltose	Sacarose	Frutose	Ribose	Galactose	Manose	Xilose	Trealose	Arabinose	Manitol
<i>C. ulcerans</i>	-	+	-	R	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	-	+	-	R	+	-	+	+	v	+	-	+	+	-	-	v	-
<i>C. diphtheriae</i>	v	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

v= variável ; R=reverso. Fonte:Adaptado de Manual of Clinical Microbiology (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009)

O sistema API-Coryne (bioMérieux) identificou satisfatoriamente as duas amostras como *C. ulcerans*, que foram denominadas BR-AD41 e BR-AD61, sendo associadas aos códigos 0111326 (99,7%; maltose-positiva) e 0111306 (96,6%; maltose-negativa), respectivamente (**Tabela 7** e **Anexo B**).

Por outro lado, o sistema Vitek identificou com baixa discriminação todas as cinco amostras de *C. ulcerans* testadas (**Tabela 7**): BR-AD22, BR-AD41 e BR-AD61 foram identificadas como *Corynebacterium amycolatum* (maltose-negativa) ou *Propionibacterium acnes* (maltose-positiva); a amostra 809 como *C. ulcerans* (catalase-positiva) ou *Arcanobacterium haemolyticum* (catalase-negativa). A amostra CDC KC 279 foi considerada como tendo muito boa discriminação para *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (93%).

Tabela 7

Características e identificação das amostras de *Corynebacterium ulcerans* pelos sistemas API-Coryne e Vitek 2

Número da Amostra/Ano	Localidade	Origem/sexo/ Idade (anos)	Sítio de isolamento/ Quadro clínico	Código API-Coryne (Probabilidade e, T=0,99)	Vitek 2 (Confiança)
BR-AD61/2012	Imbarie, Duque de Caxias, RJ, Brasil	Cão/M/ 4 anos	Nasofaringe/ Assintomático	0111306 (96,6%)	<i>C. amycolatum</i> (Maltose-negativa) ou <i>Propionibacterium. acnes</i> (Maltose-positiva) (Baixa discriminação)
BR-AD41/2012	Imbarie, Duque de Caxias, RJ, Brasil	Cão/M/ NI	Lesão cutânea (picada de carrapato)/ Assintomático	0111326 (99,7%)	
BR-AD22/2010	Itaipu, Niterói, RJ, Brasil	Cão/F/ NI	Narina/ Assintomático	0111324 (7,2%)	
CDC KC 279/NI	EUA	Animal/NI/ NI	Pulmão/ Pneumonia	0111326 (99,7%)	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (Boa discriminação)
809/2000	Laranjeiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Humano/F/ NI	Pulmão/ Pneumonia fatal	0111326 (99,7%)	<i>C. ulcerans</i> (Catalase-positiva) ou <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (Catalase-negativa) (Baixa discriminação)

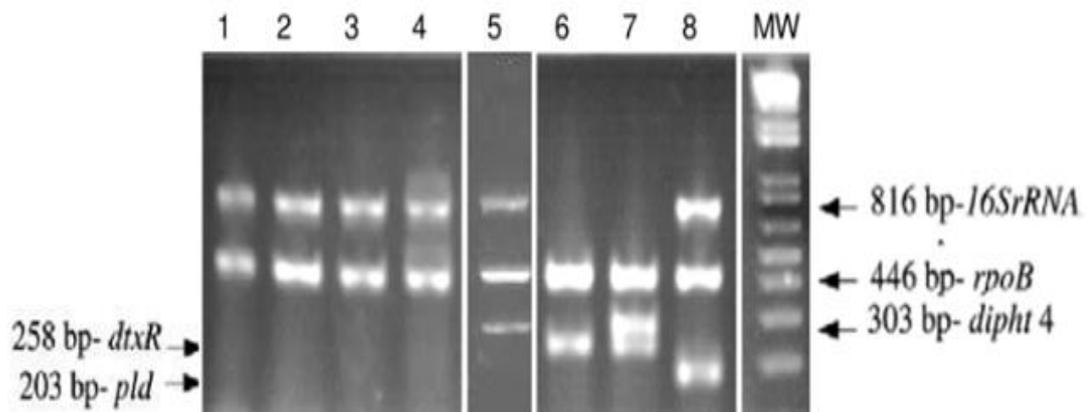
NI, Não informado; F, feminino, M, masculino.

4.3 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS DE *C.ulcerans*

4.3.1 Multiplex PCR

A amplificação pelo mPCR do gene 16S rRNA e a não amplificação do gene *pld* confirmou as amostras isoladas, BR-AD41 e BR-AD61, como *C. ulcerans*, a semelhança das amostras BR-AD22 , 809 e CDC KC 279 (**Figura 3**).

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do multiplex PCR. Linha 1: BR-AD22; linha 2: BR-AD41; linha 3: BR-AD 61, linha 4: 809; linha 5: CDC KC 279; linha 6: *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27010; linha 7: *C.diphtheriae* ATCC 27012; linha 8: *C. pseudotuberculosis* 1002 ; MW: DNA ladder



4.3.2 Sequenciamento

Os resultados apresentados na **Tabela 8** indicaram que a análise das sequências do gene 16S rRNA não foi suficiente para identificar ambas as amostras BR-AD41 e BR-AD61 como *C.ulcerans*, havendo uma maior similaridade com *C. pseudotuberculosis*. Por outro

lado, a análise das seqüências do gene *rpoB* confirmou as amostras como *C. ulcerans*. A amostra BR-AD41 teve 100% de similaridade com a cepa tipo (CIP 106504) AY492271.1

As seqüências do 16S rRNA foram depositadas no GenBank sob o número KF924749 para a amostra BR-AD41 e KF924750 para a amostra BR-AD61e para as seqüências do gene *rpoB* , sob os números KF954508 e KF954509 para as amostras BR-AD41 e BR-AD61, respectivamente.

Tabela 8

Percentagem de similaridade após sequenciamento e determinação do número de pares de base dos genes 16S rRNA e *rpoB* das amostras BR-AD41 e BR-AD61

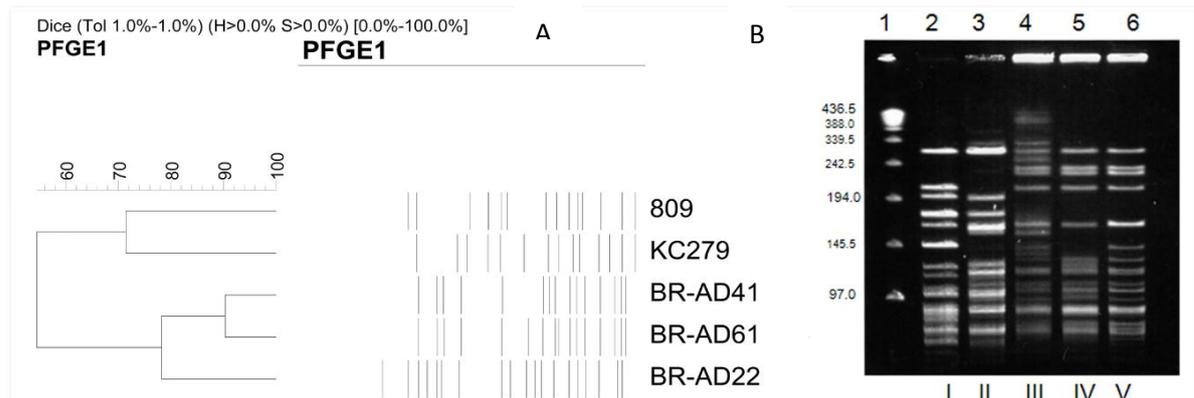
Amostras	Genes	Tamanho		% Similaridade	
Dog 61	16S rRNA	1488 pb	1479/1489 1338/1397	99,32% 99,35%	<i>C. ulcerans</i> (cepa tipo: NCTC 7910) X84256.1 <i>C. pseudotuberculosis</i> (cepa tipo: CIP 102968T)X81916.1
	<i>rpoB</i>	423 pb	420/423 391/423	99,29% 92,43%	<i>C. ulcerans</i> (CIP 106504) AY492271.1 (Khamis) <i>C. pseudotuberculosis</i> (CIP 102968) AY492239.1(Khamis)
Dog 41	16S rRNA	1502 pb	1484/1492 1390/1397	99,46% 99,50%	<i>C. ulcerans</i> (cepa tipo: NCTC 7910) X84256.1 <i>C. pseudotuberculosis</i> (cepa tipo: CIP 102968T)X81916.1
	<i>rpoB</i>	418 pb	416/416 385/416	100% 92,55%	<i>C. ulcerans</i> (CIP 106504) AY492271.1 (Khamis) <i>C. pseudotuberculosis</i> (CIP 102968) AY492239.1(Khamis)

4.3.3 Determinação dos perfis clonais pelo PFGE

O PFGE do DNA clivado pela enzima de restrição *SfiI* das 5 amostras de *C. ulcerans* revelou a presença de pulsotipos distintos que foram designados como I, II, III, IV e V (**Figura 4**). Pela análise visual, o perfil IV diferiu do perfil V em apenas 3 bandas, sendo assim, as amostras BR-AD41 e BR-AD61 foram consideradas relacionadas

epidemiologicamente, de acordo com critério de interpretação de Tenover e colaboradores (1995). Essas amostras, isoladas de cães na mesma vizinhança, exibiram $\geq 85\%$ de similaridade, sendo consideradas como pertencentes a um mesmo grupo clonal. Os outros pulsotipos (I, II e III) exibiram mais de seis bandas de diferença, indicando assim que não estão epidemiologicamente relacionadas.

Figura 4. Perfis clonais (PFGE) das amostras de *C. ulcerans* isoladas de humanos e cães. (A) Dendrograma dos dados de PFGE. (B) Bandas de PFGE. Linha 1: λ DNA ladder; Linha 2: CDC KC 279 amostra controle (USA), perfil I; Linha 3: 809 (humano), perfil II; Linha 4: BR-AD22 (cão), perfil III; Linha 5: BR-AD41 (cão), perfil IV; Linha 6: BR-AD61 (cão), perfil V.



4.4 CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAL TOXINOGÊNICO DE *C. ulcerans*

4.4.1 Toxina diftérica e toxina *Shiga-like*

As amostras isoladas BR-AD41 e BR-AD61 não apresentaram amplificação do gene *tox*, conforme ilustrado na **Figura 5**, onde se observa a ausência da banda do iniciador do *dipht4*, caracterizando assim a ausência de TD.

A análise da presença de gene *rpb* que codifica a toxina *Shiga-like*, apresentou resultado positivo para a amostra 809 isolada de humano, como já demonstrada por Trost (2011). As demais amostras de *C. ulcerans* avaliadas nesse estudo, incluindo as recém-isoladas BR-AD41 e BR-AD61 não apresentaram bandas de amplificação para o gene *rpb* (Figura 6).

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do multiplex PCR, para a caracterização de toxigenicidade das amostras. Linha 1: BR-AD22; linha 2: BR-AD41; linha 3: BR-AD 61, linha 4: 809; linha 5: CDC KC 279; linha 6: *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27010; linha 7: *C.diphtheriae* ATCC 27012; linha 8: *C. pseudotuberculosis* 1002 ; MW: DNA ladder

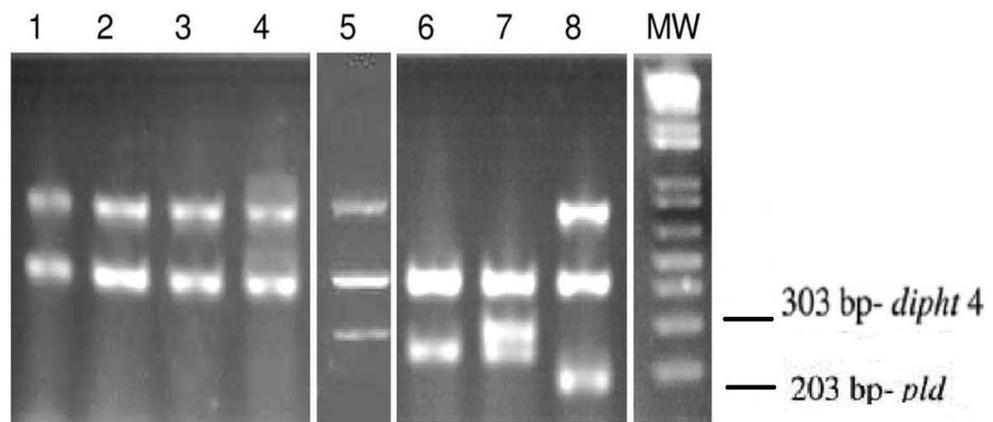
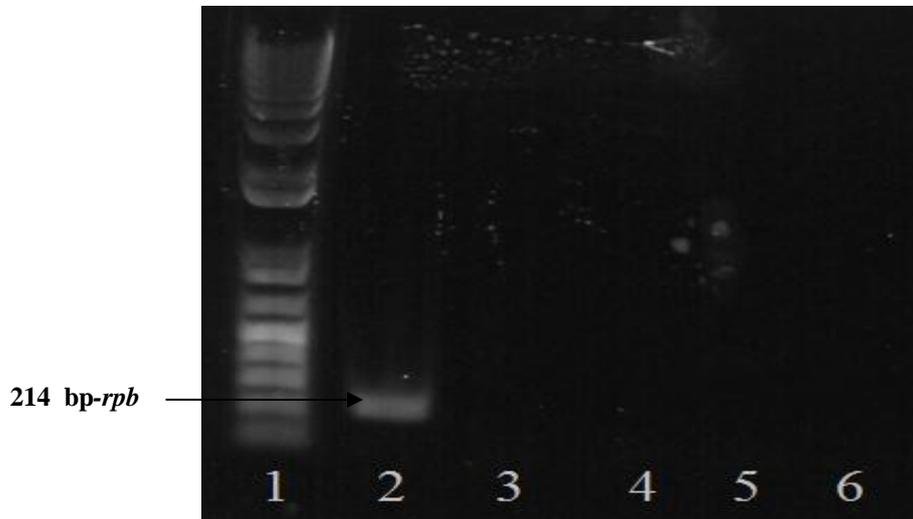


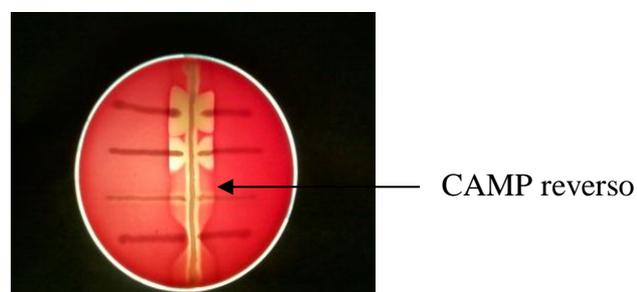
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do gene *rpb* que codifica a toxina Shiga like. Linha 1- PM, linha 2- 809; linha 3-BR-AD22; linha 4-BR-AD41; linha 5-BR-AD61; 6-CDC KC 279



4.4.2 Produção de fosfolipase D

A produção de PLD pelas amostras isoladas nesse estudo, BR-AD41 e BR-AD-61, foi demonstrada pelo efeito da inibição da atividade hemolítica de *S. aureus* e formação do CAMP- reverso, conforme ilustrado na **Figura 7**.

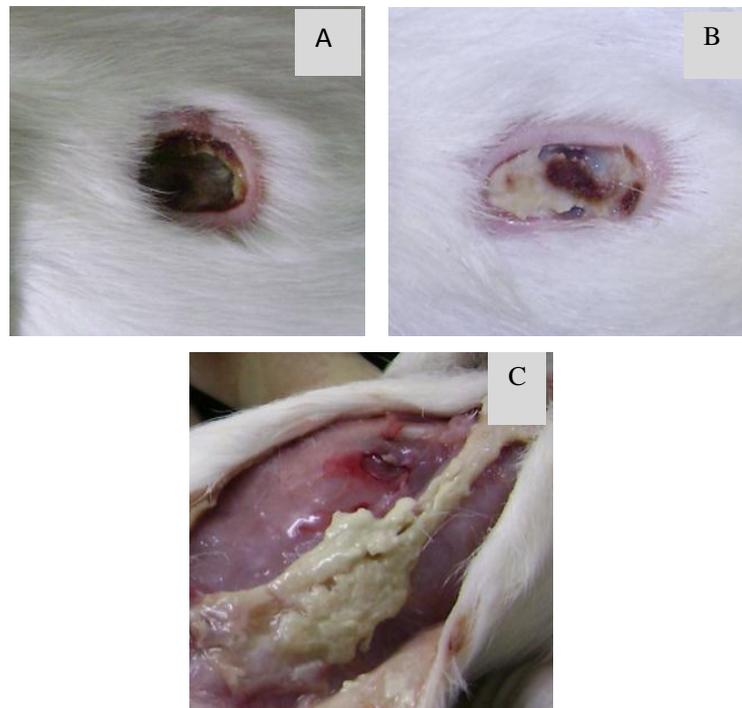
Figura 7. Formação de CAMP reverso em placa de ágar sangue de carneiro



4.4.3 Avaliação de toxigenicidade *in vivo*

Conforme ilustrado na **Figura 8**, as amostras testadas de *C. ulcerans* desprovidas de gene *tox* e inoculadas por via subcutânea foram capazes de induzir a formação de úlceras cutâneas contendo material fibrinoso branco-amarelado, evidenciando, portanto, a expressão de outros fatores de virulência que ainda precisam ser caracterizados.

Figura 8. Formação de úlceras e fibrina por amostras de *C. ulcerans*: A: amostra 809; B: amostra BR-AD22; C: extensa formação de material fibrinoso em tecido subcutâneo.



4.5 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

As amostras de *C. ulcerans* BR-AD41, BR-AD61, BR-AD22 e 809, mostraram moderada susceptibilidade para penicilina G e clindamicina (**Tabela 9**). Todas as amostras de *C. ulcerans* testadas mostraram susceptibilidade aos demais antimicrobianos testados, incluindo eritromicina e vancomicina.

Tabela 9.

Perfis de susceptibilidade de amostras de *Corynebacterium ulcerans* de origens diversas a 12 agentes antimicrobianos avaliados pelo teste de difusão em disco

Antimicrobiano	BR-AD22	BR- AD41	BR-AD61	809	CDC-KC 279
Penicilina G 10 UI	I	I	I	I	S
Ampicilina	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S	S
Clindamicina	R	R	R	I	I
Rifampicina	S	S	S	S	S
Cefotaxime	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S
Linezolida	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S

S, sensível; I, Sensibilidade intermediária; R, resistente.

4.6 PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR E PLASMA

A capacidade de *C. ulcerans* de se ligar às moléculas de Fbg, Fn e colágeno Tipo I humanos foi demonstrada em níveis variados (**Figura 9**). As três amostras de cão (BR-AD22, BR-AD41 e BR-AD61) foram capazes de ligar mais de 10% de proteínas biotinizadas, quando reagidas com 100µL de uma solução contendo 20µg/mL de proteínas biotinizadas por 1h/37°C. Dados mostraram uma equivalência na afinidade das amostras de cão BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 ao Fbg, porém as amostras BR-AD41 e BR-AD61 apresentaram menor afinidade a Fn e ao colágeno Tipo I do que a BR-AD22. Resultados do Elisa mostraram maior afinidade ao Fbg, Fn e colágeno Tipo I para a amostra BR-AD22 ($p < 0.001$). De forma oposta, a amostra 809 (isolada de um paciente humano com pneumonia fatal) aderiu às proteínas de ECM/plasma em menor intensidade ($p < 0.001$). A amostra CDC KC279 usada como controle aderiu ao colágeno Tipo I e Fn em intensidade similar às amostras BR-AD61 and BR-AD41, respectivamente ($p > 0.05$). BR-AD41 e BR-AD61 demonstraram níveis semelhantes de aderência ao Fbg ($p > 0.05$).

4.7 INTERAÇÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATOS ABIÓTICOS

4.7.1 Avaliação de interação bacteriana com superfície abiótica e hidrofóbica em microplacas de poliestireno.

Todas as amostras foram capazes de interagir com a superfície do poliestireno quando comparadas com o controle negativo (TSB; $p < 0,05$), porém em menor intensidade que *C. diphtheriae* (controle positivo fortemente aderente (++++) = $4 \times DO_c \leq DO$; $p < 0,05$). A capacidade de interação dos microrganismos com o poliestireno foi independente da produção

de TD tanto para *C. ulcerans* quanto para *C. diphtheriae* ($p > 0.05$). Dentre as amostras de *C. ulcerans*, as de origem animal BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 e CDC-KC279 foram todas consideradas como moderadamente formadoras de biofilme [(++) = $2x DO_c < DO \leq 4x DO_c$; $p > 0,05$] enquanto a amostra 809, isolada de paciente humano, se mostrou fracamente formadora de biofilme [(+) = $DO_c < DO \leq 2x DO_c$] (**Figura 10**). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes.

Figura 9. Gráficos de aderência das amostras de *Corynebacterium ulcerans* às proteínas do plasma e matriz extracelular. A amostra 809 de origem humana foi a que apresentou menor aderência; de maneira inversa, a amostra BR-AD22 atoxinogênica isolada de animal foi a que apresentou maior aderência

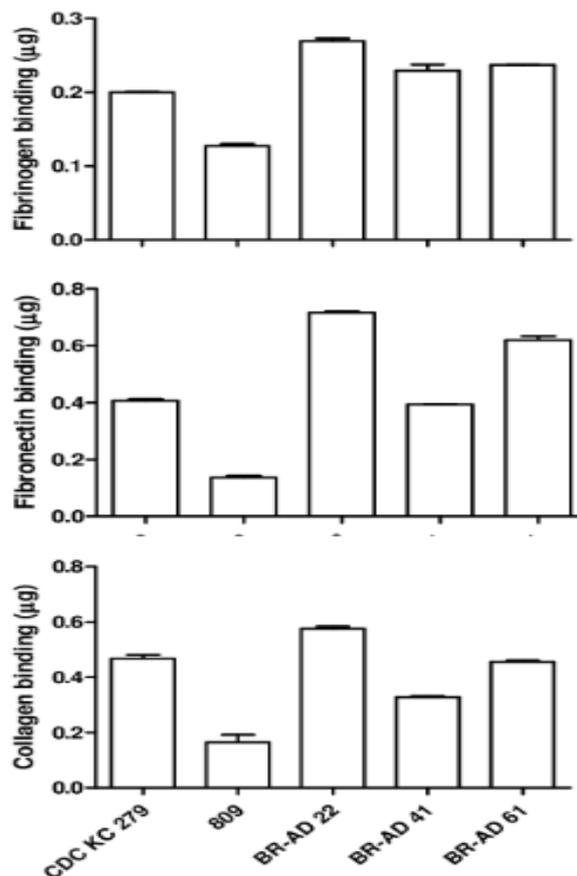
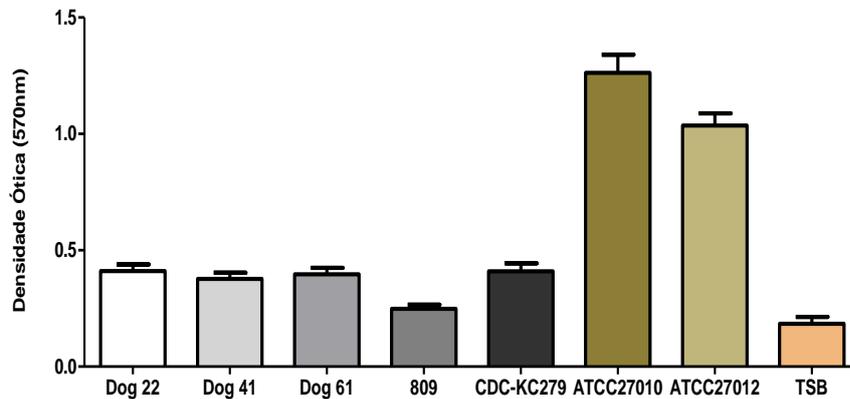


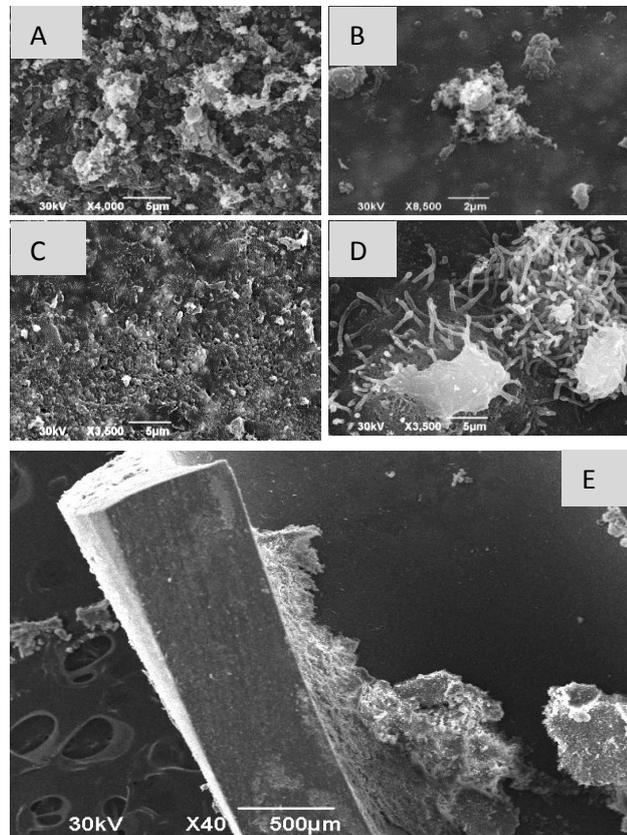
Figura 10. Interação de *Corynebacterium ulcerans* com superfície de poliestireno. As amostras foram classificadas como: 809 (origem humana), fracamente aderente (+) = $DO_c < DO \leq 2x DO_c$; BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61, CDC-KC279(origem animal), moderadamente aderente (++) = $2x DO_c < DO \leq 4x DO_c$; *C. diphtheriae* ATCC 27010 (atox) e 27012 (tox) utilizadas como controle-positivo, fortemente aderente (+++) = $4xDO_c \leq DO$.



4.7.2 Pesquisa da capacidade de produção de biofilme em cateter de poliuretano pela técnica de MEV

As amostras de *C. ulcerans* testadas mostraram-se capazes de aderir ao cateter de poliuretano, independente da origem. As imagens obtidas na microscopia sugeriram uma maior produção de biofilme para a amostra CDC KC279 (**Figuras 11D e 11E**) enquanto uma menor intensidade de produção de biofilme foi visualizada para a amostra BR-AD22 (**Figura 11B**).

Figura 11: Imagens da formação de biofilme em cateter de poliuretano pelas amostras de *C. ulcerans*. A: BR-AD41; B: BR-AD22 (menor produção de biofilme); C: 809; D e E: CDC KC279 (maior produção de biofilme).



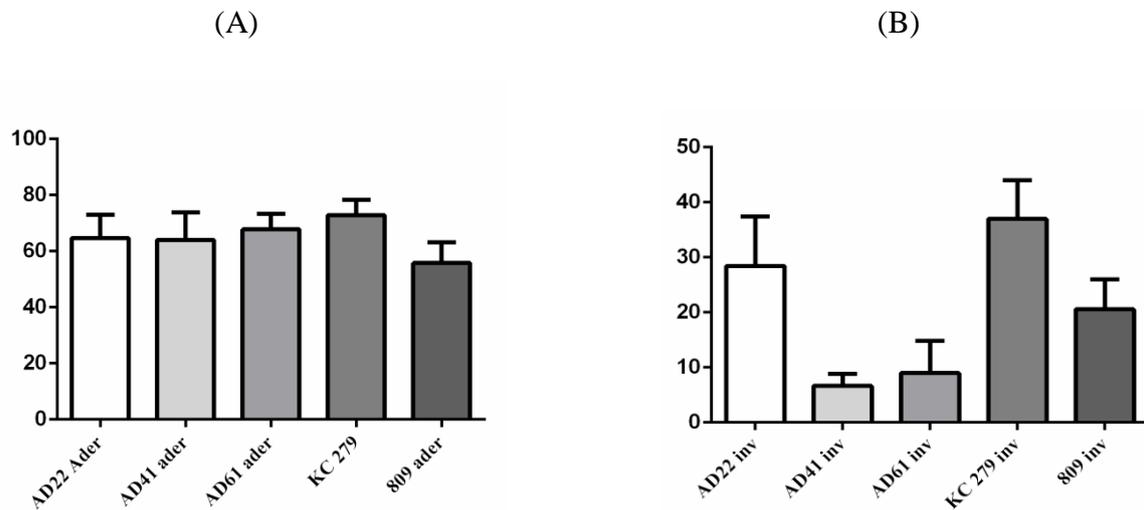
4.8 ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM CÉLULAS EPITELIAIS HUMANAS (Hep2)

Todas as amostras avaliadas de *C. ulcerans*, independente da origem, foram capazes de interagir com células epiteliais humanas em concentrações de aproximadamente 60%, mostrando sua capacidade em se associar à superfície celular (**Figura 12A**).

Todas as amostras de *C. ulcerans* foram internalizadas e capazes de sobreviver no interior de células epiteliais humanas, porém em intensidades variadas (**Figura 12B**). As amostras de origem animal CDC KC 279 e BR-AD22 apresentaram uma maior capacidade de sobrevivência citoplasmática quando comparadas com a amostra de origem humana 809. As amostras isoladas de cães domésticos BR-AD41 e BR-AD61, desprovidas de genes *tox* e *rpb* foram as que exibiram menor capacidade de sobrevivência intracelular em Hep2 (menor que

10%), porém aderiram em níveis similares e não houve diferença significativa entre as três amostras isoladas de cães. Entre a amostra CDC KC279 e as duas amostras isoladas nesse estudo, BR-AD41 e AD-61, houve diferença significativa ($p < 0,05$), no teste comparativo de Tukey.

Figura 12: Interação com células epiteliais humanas – linhagem HEp-2 - de amostras de *Corynebacterium ulcerans* isoladas de humano e de animais: (A) Percentual de bactérias associadas as monocamadas; (B) Percentual de bactérias viáveis observado no compartimento intracelular. Experimentos realizados em triplicata; $P < 0,005$.



5 DISCUSSÃO

A difteria é uma doença infectocontagiosa de evolução aguda e imunoprevinível. A vacina é composta pelo toxóide diftérico e a imunidade conferida decresce com a idade. Por somente neutralizar a TD, mas não atingir o patógeno, a vacina em suas várias combinações não elimina a infecção e o estado de portador assintomático.

Atualmente, nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, o número dos casos de difteria vem aumentando. *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* toxinogênicos podem produzir doença com risco de vida que requer tratamento urgente com antitoxina diftérica (DAT) mesmo sem a confirmação laboratorial. Casos de difteria com quadros clínicos atípicos, com infecções invasivas e ausência de pseudomembranas por amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae* têm sido descritos em maior frequência. Além disso, a difteria vem sendo relatada em indivíduos parcial ou totalmente vacinados, com ocorrência de surtos epidêmicos, inclusive no Brasil (DIAS et al, 2011a). Na Europa e Japão, o relato de casos de difteria por *C. ulcerans* ultrapassa o número de casos por *C. diphtheriae* (WAGNER et al, 2012, SEKIZUKA et al, 2012).

No Brasil, foi descrito um caso de infecção fatal por *C. ulcerans* em paciente humano, no ano de 2008, por amostra atoxinogênica (809) (MATTOS-GUARALDI et al, 2008). Nessa ocasião, o paciente era residente na zona sul da cidade do Rio de Janeiro e não houve ligação da possível fonte de infecção com animais. Adicionalmente, em 2010, foi isolada uma amostra atoxinogênica (BR-AD22) em um cão assintomático, entre 61 animais alojados em um abrigo na cidade de Niterói (DIAS et al, 2010).

Em nosso país só há o relato das duas amostras citadas anteriormente, o que levanta a questão que não há uma preocupação nem conhecimento diagnóstico dos profissionais da área da saúde para esse patógeno, a despeito da Nota Técnica N° 25.000.140.269/2010-39 do Ministério da Saúde que alerta sobre a difteria. É provável que os profissionais não saibam isolar o microrganismo e nem reconhecer um quadro clínico quando ele se apresenta. Os testes de triagem e fenotípicos demandam tempo e preparo técnico e na maioria das vezes BGPI são descartados como contaminantes. Testes genotípicos não são disponibilizados como rotina de laboratório. Nesse estudo, de 49 cães residentes em uma mesma localidade foram isoladas duas amostras, denominadas posteriormente BR-AD41 e BR-AD61, o que confirma que *C. ulcerans* está presente e circulando na população. Na Inglaterra e França foram

relatados vários casos, porém são países que têm um programa de prevenção, diagnóstico e tratamento bem estabelecido (WAGNER et al, 2012).

Os 49 cães foram avaliados e atendidos em um consultório veterinário localizado em Imbariê, distrito de Duque de Caxias. Os animais, de forma diversa aos cães de um levantamento de prevalência realizado no Japão (KATSUKAWA et al, 2012), eram domiciliados e estavam sob a responsabilidade de um proprietário, ou seja, viviam em contato estreito com o homem, servindo assim como uma potencial fonte de infecção. Não foi possível acompanhar clinicamente os animais que albergavam as duas amostras isoladas, nem monitorar a condição de saúde dos proprietários, uma vez que os mesmos não responderam às tentativas de contato realizadas em diversas ocasiões.

Imbariê é uma região da Baixada Fluminense e possui condição higiênico-sanitária desfavorável e padrão socioeconômico ainda precário. Este fato reforça o que Pesavento (2007) citou sobre fatores de virulência se expressarem em decorrência da pressão seletiva associada a condições socioeconômicas como densidade demográfica e condições higiênico-sanitárias deficientes aliadas ao convívio íntimo com animais. Imbariê apresenta as três características.

No Brasil, não há relatos de difteria por *C. ulcerans*, exceto pelo caso ocorrido em 2008 (MATTOS-GUARALDI et al, 2008). O fato de duas amostras serem isoladas numa mesma localidade, reafirma a situação de despreparo da área da saúde para este patógeno. De forma semelhante, um levantamento de prevalência de *C. ulcerans* em 583 cães no abrigo da prefeitura de Osaka, Japão, determinou o isolamento de 45 amostras em 44 cães (KATSUKAWA et al, 2012). O número de amostras isoladas foi maior, porém a população de cães avaliada foi em número muito mais elevado e possivelmente o fato de estarem todos em um abrigo facilitou a transmissão entre os animais.

Os mecanismos de virulência de *C. ulcerans* devem tornar-se uma questão de maior interesse em razão do aumento do número e da severidade dos casos de infecções em indivíduos parcial ou totalmente imunizados. Amostras de *C. ulcerans* parecem possuir um conjunto de fatores de virulência além da TD como catalase, proteases, deoxiribonuclease (DNase), neuraminidase H (NanH), endoglicosidase E (EndoE), subunidades de pili adesivos do tipo SpaDEF e exotoxina PLD (TROST et al, 2011).

Numa tentativa para investigar possíveis mecanismos que promovam a infecção por *C. ulcerans* e sua disseminação hematogênica, um estudo anterior revelou potencial artrítogênico amostra-dependente, não relacionada à produção de catalase, DNase, PLD e TD. Algumas amostras de *C. ulcerans* demonstraram um maior potencial artrítogênico e de mortalidade

quando comparadas com amostras de *C. diphtheriae* durante infecção experimental *in vivo* em camundongos. A artrite por *C. ulcerans* resultou de uma disseminação hematogênica e bactérias viáveis foram recuperadas em articulações, sangue, rins, fígado e baço, mas não de coração e pulmões dos camundongos (GAEDE; HEESEMANN, 1995, TISSI et al, 1999, PULITI et al, 2006, DIAS et al, 2011b). A amostra humana 809 (atoxinogênica) causou úlcera com uma grande extensão de depósitos fibrinosos branco-amarelados no membro inferior da paciente (MATTOS-GUARALDI et al, 2008). Atividade dermonecrótica foi também observada tanto para 809 como para BR-AD22 em experimentos realizados em cobaias (MATTOS-GUARALDI et al, 2008).

As 45 amostras isoladas no Japão apresentaram o mesmo código 0111326 pelo sistema API-Coryne (KATSUKAWA et al, 2012). Por se tratarem de animais abrigados em um mesmo local, o autor sugeriu a fácil transmissão entre os cães. As amostras avaliadas BR-AD41, 809 e CDC KC279 apresentaram códigos iguais pelo sistema Api-Coryne (0111326); a BR-AD61 apresentou o código 0111306 e a BR-AD22, 0111324. O sistema Vitek, usado para identificação microbiológica baseado em um banco de dados limitado, não forneceu uma boa identificação, inclusive fornecendo resultados de espécies e gêneros diversos. Possivelmente o tempo de processamento é curto para que todas as reações de identificação possam ocorrer, *C. ulcerans* tem o metabolismo de açúcares mais lento, o que pode fornecer resultados falsos.

As amostras isoladas nesse estudo, BR-AD41 e BR-AD61, tiveram os genes 16S rRNA e *rpoB* sequenciados, porém a identificação final só foi possível pelo gene *rpoB*, conforme descrito em literatura (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004).

As amostras isoladas BR-AD41 e BR-AD61 não apresentaram o gene *tox*, diversamente das amostras isoladas no Japão, já que um dos cães alojado no abrigo japonês, tanto albergava uma amostra atoxinogênica como uma toxinogênica, porém essas amostras eram indistinguíveis entre si em relação a outras características. Na ocasião, os autores levantaram a possibilidade de uma amostra ter adquirido o gene *tox* de um bacteriófago ou mesmo da amostra atoxinogênica ter perdido seu gene (KATSUKAWA et al, 2012). Entretanto, as amostras de *C. ulcerans* BR-AD41 e BR-AD61, isoladas nesse estudo, evidenciaram a produção de fosfolipase D através da formação de CAMP-reverso. Amostras de *C. ulcerans* produtoras de PLD, mas não da TD, são capazes de causar doença severa no homem, como linfadenites, dermatites, abscessos cutâneos, farigite aguda e infecções no trato respiratório inferior (pneumonia e nódulos granulomatosos em tecido pulmonar) (DESSEAU et al, 1995, HOMMEZ et al, 1999, HATANAKA et al, 2003, DIAS et al, 2011a).

Conseqüentemente, amostras de *C. ulcerans* não produtoras de TD não devem ser subestimadas. PLD pode causar um aumento na permeabilidade vascular, tem propriedades dermonecroticas e reduz a viabilidade de neutrófilos e macrófagos (SCHMIEL; MILLER, 1999). Adicionalmente, amostras de *C. ulcerans* apresentam potencial de toxigenicidade através de experimentos *in vivo*, como demonstrado anteriormente em experimentos em cobaio e pela formação da úlcera com depósito de fibrina na perna da paciente pela amostra 809.

O tratamento e antibioticoterapia de doença diftérica causada por *C. ulcerans* deve seguir as orientações clínicas para pacientes infectados com *C. diphtheriae*. Um antibiótico apropriado (penicilina ou eritromicina) deve ser usado para eliminar o agente causal, interromper a produção de exotoxina e reduzir a comunicabilidade (PICKERING et al, 2009, WAGNER et al, 2010, CDC, 2011, 2012, SEKIZUKA et al, 2012). Clindamicina é formalmente considerada como uma alternativa no tratamento de portadores de bacilos diftéricos, especialmente naqueles que possuem sensibilidade a penicilina (ZAMIRI; McENTEGAR, 1972), porém, em nosso estudo, as amostras de *C. ulcerans* mostraram susceptibilidade intermediária ou resistência à clindamicina, de maneira semelhante às amostras isoladas no estudo realizado no Japão (KATSUKAWA et al, 2012).

Perfis similares de PFGE ou ribotipos foram previamente observados em amostras de *C. ulcerans* isoladas de processos infecciosos ou de colonização em humanos e animais (KATSUKAWA et al, 2009, KOMIYA et al, 2010, BERGER et al, 2011, KATSUKAWA et al, 2012). No estudo realizado no Japão, de 45 amostras de *C. ulcerans* isoladas em cães, 39 eram do perfil predominante A2 e todas mostraram resistência ou sensibilidade diminuída a clindamicina. Os autores sugerem que pode ter ocorrido a transmissão entre cães assintomáticos (KATSUKAWA et al, 2012). No nosso estudo, a heterogeneidade dos perfis de PFGE observada nas amostras isoladas de humano e cães indicam endemicidade de *C. ulcerans* na área metropolitana do Rio de Janeiro. Interessantemente, as amostras identificadas nesse estudo (BR-AD41 e BR-AD61) geraram dois perfis epidemiológicos relacionados (perfis IV e V). As amostras de *C. ulcerans* dos cinco perfis de PGFE mostraram moderada susceptibilidade à penicilina G e à clindamicina, como previamente demonstrado para amostras brasileiras de *C. diphtheriae* (PEREIRA et al, 2008). Os diversos pulsotipos foram capazes de aderir a superfícies inertes sólidas e superfícies cutâneo-mucosa de humanos.

A capacidade de formar biofilme é uma preocupação na Medicina, no que concerne a possibilidade em propiciar infecções graves e resistentes ao uso de antimicrobianos (GOMES

et al., 2009). Alguns fatores determinam a formação e extensão de biofilme quando um dispositivo médico é contaminado. Primeiro, o patógeno deve aderir à superfície exposta por um tempo longo o bastante para se fixar irreversivelmente. A taxa de adesão e fixação depende do tipo e número de microrganismos no líquido ao qual o dispositivo está exposto e do fluxo desse líquido e das características físico-químicas do dispositivo (DONLAN, 2001). Os biofilmes favorecem a manutenção dos organismos em superfícies abióticas e substratos orgânicos e protege os microrganismos da fagocitose, de anticorpos opsonizantes, da ativação do complemento e da fagocitose (GOMES et al, 2009). Conforme relatado por Trost e colaboradores (2011), *C. ulcerans* possui em seu genoma genes codificadores para proteínas de adesão em superfície e proteínas de fímbrias, responsáveis pelo contato e adesão às células do hospedeiro. Em nosso estudo, foi demonstrada a capacidade de formação de biofilme por todas as amostras de *C. ulcerans*, tanto pelas amostras isoladas nesse estudo (BR-AD41 e BR-AD61), como pelas amostras previamente isoladas (BR-AD22, 809 e CDC-KC279), em superfícies abióticas, como poliuretano e poliestireno. Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar e evidenciar diferentes níveis de formação e arranjo do biofilme sobre o poliuretano.

Fibrinogênio é a principal proteína no plasma humano, e tem sua síntese dramaticamente aumentada durante a inflamação ou sob condições de estresse, tais como infecções sistêmicas. Portanto, não surpreende que muitos patógenos bacterianos possam interagir com Fbg e manipulá-la biologicamente (RIVERA et al, 2007). Fbg está primariamente envolvido na cascata de coagulação através de sua conversão em fibrina insolúvel. Ambos Fbg e fibrina representam atividade intrínseca na coagulação sanguínea, fibrinólise, resposta inflamatória, interações celulares e de matriz, e cicatrização de feridas. Muitos patógenos bacterianos exploram mecanismos envolvidos no sistema de coagulação para colonizar proteínas de matriz expostas ou evadir-se de mecanismos imunes de remoção bacteriana (DOOLITTLE, 1984, LANTZ et al, 1985, MOSESSON, 1975, SUN, 2006). A presença de Fbg nas superfícies bacterianas pode ser um excelente meio de evitar a fagocitose em hospedeiros humanos, como previamente descrito para outros patógenos Gram-positivos (SCHUBERT et al, 2002, RENNERMALM; NILSSON; FLOCK, 2004, PIERNO et al, 2006), incluindo *C. diphtheriae* (GOMES et al, 2009, SABBADINI et al, 2010). Semelhante ao *C. diphtheriae*, diferenças qualitativas e quantitativas na expressão de adesinas de ligação ao Fbg podem contribuir para as variações no potencial de virulência para o hospedeiro humano e na formação de pseudomembranas pelas cepas de *C. ulcerans* (SABBADINI et al,

2010). *C. ulcerans* mostrou capacidade de ligação ao Fbg em diversos níveis, sendo que a amostra isolada de paciente humano foi a que apresentou o menor nível de ligação ao Fbg.

As amostras de *C. ulcerans* mostraram afinidade a Fn plasmática e colágeno Tipo I humanos em intensidades variadas. Fibronectina é uma glicoproteína complexa encontrada na forma solúvel em muitos fluidos corporais (sangue, saliva) e na forma insolúvel como um componente de superfícies celulares, membranas basais, e matrizes extracelulares. Fn plasmática solúvel interage com várias bactérias e superfícies celulares, podendo servir como um receptor para a aderência da bactéria à célula epitelial do hospedeiro, tendo assim, um importante papel no tropismo tecidual e simultaneamente de ligação ao Fbg, fibrina, colágeno, células humanas e bactérias (MOSHER, 1975, RUOSLAHTI; VAHERI, 1975, ENGVALL; RUOSLAHTI, 1977, ENGVALL; RUOSLAHTI; MILLER, 1978, LIVORNESE; KORZENIOWSKI, 1992). Colágeno Tipo I é a forma mais prevalente de vários tipos distintos de colágeno observados em paredes arterianas, ossos, dentina, derme, tendões e parede uterina. Todos os tipo de colágeno são ativos na ligação com Fn, porém em graus variados (ENGVALL; RUOSLAHTI; MILLER, 1978). A ligação ao colágeno e Fbg é mediada pelo mesmo sítio de ligação da fibronectina.

Como no estudo com Fbg, a amostra isolada de paciente humano (809), foi a que apresentou o menor grau de ligação com Fn e colágeno. Como as moléculas testadas são de origem humana, é possível que as amostras isoladas de animais precisem exibir um grau de ligação maior às proteínas de ECM/plasma para poderem expressar seus fatores de virulência.

O primeiro passo no processo de infecção de patógenos extracelulares como *C. diphtheriae* é geralmente a adesão e colonização da superfície dos tecidos do hospedeiro. Evidências de outros patógenos Gram-positivos sugerem que adesinas de superfície bacteriana reconhecendo moléculas de adesão na matriz podem servir como candidatas com potencial antigênico para o desenvolvimento de novas imunoterapias, inclusive para doença do tipo diftérica e infecções invasivas causadas por *C. ulcerans* (RIVERA et al, 2007). Vários quadros de doença invasiva, como nódulos pulmonares, artrite, abscesso axilar e peritonite foram relatados onde o agente causal foi o *C. ulcerans*, portanto a capacidade de adesão e colonização está presente nesse patógeno, a despeito de presença de TD.

Na presente investigação foi demonstrado que, além de internalizar em macrófagos, (SANTOS et al, 2010), *C. ulcerans* é capaz de interagir com células epiteliais humanas. Esses dados enfatizam a capacidade de *C. ulcerans*, um patógeno classicamente relacionado à infecção animal, de colonizar e/ou infectar tecidos humanos. A habilidade em causar lesão e disseminar pelos tecidos parece estar relacionada à capacidade de sobrevivência intracelular e

independe da presença de toxina diftérica e *Shiga-like*, conforme demonstrado nos ensaios de células HEp2 e cobaios. A atividade citotóxica da fosfolipase não impediu a interação dos patógenos com as células epiteliais.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- Amostras de *C. ulcerans* estão presentes em cães assintomáticos domiciliados e podem ser encontradas em circulação entre a população na região metropolitana do Rio de Janeiro.
- A PCR multiplex é capaz de identificar com eficácia as amostras de *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, assim como a presença do gene *tox*.
- O sistema semi-automatizado Api-Coryne foi capaz de fornecer a identificação das amostras de *C. ulcerans* estudadas porém o sistema automatizado Vitek 2 não forneceu uma boa identificação.
- A análise das sequências do gene 16S rRNA das amostras isoladas de *C. ulcerans* não é suficiente para a identificação, é necessário o sequenciamento do gene *rpoB* para que haja uma distinção entre as espécies *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, conforme relatado em literatura (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004).
- As amostras de *C. ulcerans* isoladas (BR-AD41 e BR-AD61) não apresentaram o gene *tox* e consequente expressão de toxina diftérica; porém a expressão de toxigenicidade foi observada pela presença de PLD (formação de CAMP-reverso). Adicionalmente, teste genotípico (PCR) identificou o gene *rpb* (*Shiga-like*) somente para a amostra 809.
- As amostras isoladas (BR-AD41 e BR-AD61) apresentaram moderada sensibilidade à penicilina G e resistência à clindamicina.
- A análise realizada pelo PFGE das amostras de *C. ulcerans* estudadas (BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61, 809 e CDC-KC 279) gerou pulsotipos distintos. Interessantemente, as duas amostras recém-isoladas (BR-AD61 e BR-AD41) exibiram $\geq 85\%$ de similaridade e estão relacionadas epidemiologicamente e pertencem ao mesmo grupo clonal. Portanto, *C. ulcerans* está em circulação na região geográfica onde elas foram identificadas e sua introdução no ambiente não foi recente, ou seja, existe uma fonte de infecção em potencial para a população.
- *C. ulcerans* mostrou capacidade em se ligar a superfícies abióticas, como poliestireno e poliuretano, o que demonstra a possibilidade de formação de biofilme, como fator de virulência.

- Além disso, as amostras se ligaram em variados níveis a Fbg, Fn e colágeno tipo I humanos. As amostras isoladas de animais - BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 e CDC KC279 – se ligaram em níveis maiores que o da amostra humana 809.
- *C. ulcerans* mostrou capacidade de aderir e invadir células epiteliais humanas em níveis variados, independente da presença de TD. No caso de associação, as amostras oriundas de animais mostraram um nível maior; na capacidade de invadir e sobreviver em meio intracelular, a origem da fonte de infecção, animal ou humana, não interferiu no resultado.
- Amostras de *C. ulcerans* podem ser encontradas colonizando a população animal (cães e gatos) domiciliada e, portanto, em contato estreito com o homem na região metropolitana do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

- BAIO, P.V. et al. Clonal multidrug resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 23–29, 2013.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J Comp Pathol**, v. 137, p. 179-21, 2007.
- BERGER, A. et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in woman and cat. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1767-1768, 2011.
- BONMARIN, I. et al. Diphtheria: a zoonotic disease in France? **Vaccine**, v. 27, p. 4196-4200, 2009.
- BRASIL. ANVISA. **Plano Diretor de Vigilância Sanitária/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 1 ed. – Brasília: Anvisa, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Eletrônico Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Ano 10, nº 2, 2010a.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica: Nº 25.000.140.269/2010-39: **Informe sobre a Difteria no Brasil**. Brasília, 2010b.
- BRASIL. Lei 8080, 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 20/09/1990. Seção 1, p.18055.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vacinação da criança**. Disponível em: <http://www.portalsaude.gov.br/> / ago 2012. Acessado em 15 de agosto de 2012.
- BITRAGUNTA, S. et al. Safety and immunogenicity of single dose of tetanus–DIPHTHERIA (Td) vaccine among non/partially immune children against diphtheria and/or tetanus, Hyderabad, India, 2007. **Vaccine**, v. 28, p. 5934-5938, 2010.
- CASSIDAY, P.K. et al. Analysis of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains revealing potential for false-negative real-time PCR results. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 331-333, 2008.
- CCAC. Canadian Council on Animal Care. **Guidelines on: procurement of animals used in science**. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Procurement.pdf>. Acessado em 10 mar. 2013.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. Three cases of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection. **Commun Dis Rep CDR Wkly**, v. 10, p. 49-52, 2000.
- CDC– Center for Disease Control and Prevention. Notes from field: Respiratory diphtheria-like illness caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans*-Idaho, 2010. **MMWR** v. 60, n.3, p.77, 2011.

CEPERJ – Fundação Centro Estadual de Estatísticas, Pesquisas e Formação de Servidores do Rio de Janeiro. Disponível em:

http://www.ceperj.rj.gov.br/ceep/info_territorios/divis_regional.html. Acessado em 03 de dezembro de 2013.

CEZAR, G.; ABRANTES, P. C. C. Princípio da Precaução: considerações epistemológicas sobre o Princípio e sua relação com o processo de análise de risco. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 2, p. 225-262, 2003.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Tenth Edition. CLSI document M02-A10, 2013

CONTZEN, M. et al. *Corynebacterium ulcerans* from diseased wild boars. **Zoonoses Public Health**, v. 58, n. 7, p. 479-88, 2011.

DALLARI, S. G.; VENTURA, D. F. L. O princípio da precaução: dever do Estado ou protecionismo disfarçado? **São Paulo em Perspectiva**, v. 16, n. 2, p. 53-63, 2002.

DESSEAU, R.B. et al. Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. **Eur Respir J**, v. 8, n.4, p. 651-653, 1995.

DEWINTER, L. M.; BERNARD, K. A.; ROMME, Y. M. G. Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3447-3449, 2005.

DE ZOYSA, A. et al. Molecular epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from Northwestern Russia and surrounding countries studied by using ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 1080-83, 1995.

DIAS, A. A. S. O. et al. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. **Vec Born Zoon Dis**, v. 10, n. 8, p. 743-748, 2010.

DIAS, A. A. S. O. et al. *Corynebacterium ulcerans*: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. **Rev Saúde Pública**, v. 45, p. 6, 2011a.

DIAS, A. A. S. O. et al. Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. **Vet Microbiol**, v.15, n 3-4, p. 323-31, 2011b.

DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and fibrin. **Annu Rev Biochem**, v. 53, p.195-229, 1984.

DONLAN, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerg Infect Dis**, v.7, n. 2, p. 277-281, 2001.

DORELLA, F.A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet Res**, v. 37, p. 201–218, 2006.

DURBARCÃ, S. Antitetanus and antidiphtheria immunity in newborns. **Roum Arch Microbiol Immunol**, v. 58, p. 267-272, 1999.

- EFSTRATIOU, A.; GEORGE, R.C. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheria* and *Corynebacterium ulcerans*. **Commun Dis Public Health**, v. 2, p. 250–257, 1999.
- ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. **Int J Cancer**, v. 20, p.1-5, 1977.
- ENGVALL, E., RUOSLAHTI, E.; MILLER, E. J. Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. **J Exp Med**, v 147, p.1584-1595, 1978.
- FORMIGA, L. C. D. Diagnóstico Microbiológico da Difteria. **Rev Bras Pat Clin**, v. 22, p. 52-58, 1986.
- FORMIGA, L.C.D.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Diphtheria: current status and laboratory procedures for diagnosis. **Rev Bras Pat Clin.**, v.29, p. 93-96, 1993.
- FORMIGA, L.C.D.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Difteria: profissionais susceptíveis, diagnóstico, vacinação e reparação de danos. **J Bras Pat**, v. 37, n. 4, p. 292-293, 2001.
- FUNKE, G.; BERNARD, A.K. Coryneform Gram-positive rods. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology**. Washington, DC: Ed. ASM Press, 2009. p. 485–514.
- GALAZKA, A. M. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. **J Infect Dis**, v. 181, p. S2-9, 2000.
- GALAZKA, A. M.; ROBERTSON, S. E. Diphtheria: changing patterns in the developing world and the industrialized world. **Eur J Epidemiol**, v. 11, p. 107-117, 1995.
- GAEDE, K. I.; HEESEMANN, J. Arthritogenicity of genetically manipulated *Yersinia enterocolitica* serotype O8 for Lewis rats. **Infect Immun**, v. 63, p. 714–719, 1995.
- GILBERT, R.; STEWART, F.C. *Corynebacterium ulcerans*: a pathogenic microorganism resembling *C. diphtheria*. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 12, p. 756-761, 1926.
- GOMES, D. L. R. **Participação de carboidratos de superfície de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* na hemaglutinação**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- GOMES, D. L. R. et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 1419–1427, 2009.
- GUIMARÃES, A. L. et al. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. **BMC Vet Res**, v. 7, p. 68, 2011.
- HADFIELD, T. L. et al. The pathology of diphtheria. **J Infect Dis**, v. 181, p. 116–120, 2000.
- HALL, A. J. et al. Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. **Emerg Infect Dis**, v. 16, p. 688-691, 2010.

HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

HATANAKA, A. et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. **Emerg Infect Dis**. v. 9, p. 752-753, 2003.

HIRATA JR, R. et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 24, p. 115-119, 2002.

HIRATA JR, R. et al. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Microb Pathog**, v. 36, p.125-130, 2004.

HIRATA JR, R. et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheria* of different clonal groups in endocarditis. **Braz J Med Biol Res**, v 41, p. 986-991, 2008.

HOMMEZ, J. et al. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 954–957, 1999.

KATSUKAWA, C. et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from the domestic dog for the first time in Japan. **Jpn J Infect Dis**, v. 62, p. 171-172, 2009.

KATSUKAWA, C. et al. Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka, Japan. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 266-273, 2012.

KOMYIA, T. et al. Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. **J Med Microbiol**, v. 59, p. 1497–1504, 2010.

KIMURA, Y. et al. Acute peritonitis due to *Corynebacterium ulcerans* in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis: a case report and literature review. **Clin Exp Nephrol**, v. 15, p. 171-174, 2011.

KHAN, N et al. Resurgence of diphtheria in the vaccination era. **Indian J Med Microbiol**, v. 25, p. 434, 2007.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *Corynebacterium* species *rpoB* gene sequencing for identification. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 9, p. 3925–3931, 2004.

LANTZ, M.S. *Bacteroides intermedius* binds fibrinogen. **J Bacteriol**, v. 163, p. 623-628, 1985.

LEITZ, N.; LEITZ, Z.; SCHALLER, M. Unwanted baggage. **B.MJ Case Rep**. pii: bcr2013009260. doi: 10.1136/bcr-2013-009260, 2013.

LIVORNESE, L.L.; KORZENIOWSKI, O.M. Pathogenesis of infective endocarditis. In: KAYE, D. (ed) **Infective endocarditis**. New York: Raven Press Ed, 1992, p. 19-35.

MACAMBIRA, R. P.; FORMIGA, L. B.; FORMIGA, L. C. D. Difteria: O grave prognóstico brasileiro. **J Bras Med**, v. 66, p. 69-81, 1994.

MacGREGOR, R.R.C. *Corynebacterium diphtheriae*. In: MANDRELL, D.L., DOUGLAS, R.G., BENNET, J.E. (Eds). **Enfermedades Infecciosas. Principios y Pratica II**. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panam., 1990.

MAN, P. et al. Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen/deuterium exchange measurements. **FEBS J**, v. 277, p. 653-666, 2010.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ORTEGA, M. C.; SUÁREZ, A. I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 1318-21, 1995.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Agglutination of sheep erythrocytes by *Corynebacterium diphtheriae*. **Braz J Med Biol Res**, v. 19, p. 75-77, 1986.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. *Corynebacterium diphtheriae* and diphtheroids: adhesive properties. **Rev Bras Pat Clin**, v. 27, p. 53-59, 1991.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Hemagglutination pattern of *Corynebacterium diphtheriae*. **Rev Microbiol**, v. 23, p. 8-12, 1992.

MATTOS-GUARALDI, A. L. et al. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. **FEMS Microbiol Lett**, v. 170, p. 159-166, 1999.

MATTOS-GUARALDI, A. L. et al. Diphtheria remains a threat to health in the developing world - an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 987-93, 2003.

MATTOS-GUARALDI, A. L. et al. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing diphtheria-like toxin in human with pulmonary infection in Rio De Janeiro metropolitan area, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 396-400, 2008.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA JR, R.; DAMASCO, P. V. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos sobre o cenário atual. **Rev Ass Bras Imun**, v. 1, p. 1-19, 2011.

MCNAMARA, P. J.; CUEVAS, W. A.; SONGER, J.G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. **Gene**, v. 14, n. 156, p. 113-118, 1995.

MORTIMER, E. A.; WHARTON, M. Diphtheria toxoid. In SA Plotkin, WA Orenstein, eds. **Vaccines**. USA: Ed. WB Saunders, 1999, 3rd, p.140-157.

MOSESSON, M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J Thromb Haemost**, v. 3, p.1894-1904, 1975.

MOSHER, D. F. Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. **J Biol Chem**, v. 250, p. 6614-6621, 1975.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**, 10^a ed., v. 1, p. 433, Washington, DC: ASM, 2009.

NAKAO, H. et al. Heterogeneity of diphtheria toxin gene *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 7, p. 1711-6, 1996.

NAKAO, H.; POPOVIC, T. Development of a direct PCR for detection of the diphtheria toxin gene. **J Clin Microbiol**, v.7, p. 1651-1655, 1997.

ÖLANDER, R. M. et al. High tetanus and diphtheria antitoxin concentrations in finish adults-time for new booster recommendations? **Vaccine**, v. 27, p. 5295-5298, 2009.

PACHECO, L. G. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J Med Microbiol**, v. 56, n. 4, p. 480-6, 2007.

PALLEN, M. J. et al. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. **J Clin Pathol**, v. 47, p. 353-356, 1994.

PAVAN, M. E. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). **Res Vet Sci**, v. 92, n. 2, p. 202-6, 2011.

PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin Infect Dis**, v. 24, n.2, p.185-91, 1997.

PEREIRA, G. A. et al. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 507-10, 2008.

PERKINS, S. L. et al. Pericarditis and pleuritis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a horse. **J Am Vet Med Assoc**, v. 224, p. 1133-8, 2004.

PESAVENTO P. A. et al. Fatal *Streptococcus canis* infections in intensively housed shelter cats. **Vet Pathol**, v. 44, p. 218-221, 2007.

PICKERING, L.K. et al. Diphtheria In: Red Book. **Report of the Committee on Infectious Diseases**. Illinois: American Academy of Pediatrics 28th ed, 2009, p. 280-283.

PIERNO, M. et al. FbsA-driven fibrinogen polymerization: a bacterial "deceiving strategy". **Phys Rev Lett**, v. 96, n. 2, p. ?????, 2006.

PIMENTA, F. P. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. **J Med Microbiol**, v. 57, n. 11, p. 1438-9, 2008.

PULITI, M. et al. Experimental model of infection with nontoxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 229-235, 2006.

PUTONG, N. et al. Diphtheria-like illness due to *Corynebacterium ulcerans* infection. **Trop Med Health**, v. 39, n. 1, p. 1-2, 2011.

RENNERMALM, A.; NILSSON, M.; FLOCK, J.I. The fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis* is a target for opsonic antibodies. **Infect Immun**, v 72, p. 3081-3088, 2004.

RIVERA, J. et al. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. **Thromb Haemost**, v. 98, p. 503-511, 2007.

RUOSLAHTI, E., VAHERI, A. Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma. **J Exp Med**, v. 141, p. 497-501, 1975.

SABBADINI, P. S. et al. Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v 105, p. 706-711, 2010.

SABBADINI, P. S. et al. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. **Microb Pathog**, v. 52, p. 165-176, 2012.

SAIKYA, L. et al. Diphtheria outbreak in Assam, India. **South Asian J Trop Med Public Health**, v. 41, p. 647-652, 2010.

SANTOS, L.S. **Estudo sobre os efeitos do telurito de potássio em atividades biológicas do *Corynebacterium diphtheriae***. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) _Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SANTOS, C. S. et al. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2010.

SCHUBERT, A. et al. A fibrinogen receptor from group B Streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive units novel ligand binding sites. **Mol Microbiol**, v 46, p. 557-569, 2002.

SCHUHEGGER, R. et al. Pigs as source for toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Emerg Infect Dis**, v. 15, p. 1314-1315, 2009.

SCHMIEL, D.H.; MILLER, V.J. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes Infect**, v. 1, p.1103-1112, 1999.

SEKIZUKA et al. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheria* NCTC 13129 prophage. **BMC Microbiology**, v. 12, n.72, p.1-7, 2012.

SETO, Y. et al. Properties of coryneophage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. **Jpn J Infect Dis**, v. 61, p. 116-122, 2008.

SHARPE, A. E. et al. Concurrent outbreak of tuberculosis and caseous lymphadenitis in a goat herd. **Vet Rec**, v. 166, p. 591-592, 2010.

SOARES, S. C et al. Plasticity of *Corynebacterium diphtheriae* pathogenicity islands revealed by PCR. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 2, p. 1290-4, 2011.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

SUN, H The interaction between pathogens and the host coagulation system. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p.281-288, 2006.

SYKES, J .E. et al. *Corynebacterium ulcerans* bronchopneumonia in a dog. **J Vet Intern Med**, v. 24, p. 973-976, 2010.

TAYLOR, J. et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection in a veterinary student in London, United Kingdom. **Euro Surveill**, v. 15, n. 46, p. 1-3, 2010.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TISSI, L. et al. Role of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1b, and interleukin-6 in a mouse model of group B streptococcal arthritis. **Infect Immun**, v. 67, p. 4545–4550, 1999.

TIWARI, T.S.P. et al. Investigations of 2 cases of Diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Clin Infect Dis**, v. 48, p. 395-401, 2008.

TORRES et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 272-279, 2013.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TROST, E. et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. **BMC Genomics**, v. 12, p. 383, 2011.

URUKAWA, T. et al. Subcutaneous abscess formation in the upper extremity caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **J Med Microbiol**, v. 62, p. 489-493, 2013.

VENGADESAN, K.; NARAYANA, L. Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins. **Protein Science** v 20, p. 759-772, 2011.

VON HUNOLSTEIN, C. et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. **J Med Microbiol**, v. 52, p. 181-188, 2003.

WAGNER, J. et al. Infection of skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. **Clin Inf Dis**, v. 33, p. 1598-1600, 2001.

WAGNER, K. S. et al. Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. **Epidemiol Infect**, v. 138, p. 1519-1530, 2010.

WAGNER, K. S. et al. Diphtheriae in the Postepidemic Period, Europe, 2000-2009. **Emerg Infect Dis**, v.18, n.46, p. 217-225, 2012.

WANG, J.; LONDON, E. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. **Biochemistry**, v. 48, p. 10446-10456, 2009.

WATTS, J. et al. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. **J Dairy Sci.**, v. 83, p. 2373-2379, 2000.

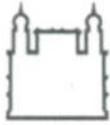
WILSON, A. P. R. The return of *Corynebacterium diphtheriae*: the rise of non-toxinogenic strains. **J Hosp Infect**, v. 30, p. 308-312, 1995.

WONG, T. P.; GROMAN, N. Production of diphtheria toxin by selected isolates of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infect Immun**, v. 43, p. 1114-1116, 1984.

YANAGAWA, R.; HONDA, E. Presence of pili-species of human and animals parasites and pathogens of genus *Corynebacterium*. **Infect Immun**, v. 13, p. 1293-1295, 1976.

ZAMIRI, I.; McENTEGAR, M. G .T. The sensitivity of diphtheria bacilli to eight antibiotics. **J Clin Path**, v. 25, p.716-717, 1972.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-64/12

Certificamos que o protocolo (P-18/12-3), intitulado "Pesquisa de Corinebactérias potencialmente produtoras de toxina em cães e gatos domésticos na região metropolitana do Rio de Janeiro.", sob a responsabilidade de **MARIA HELENA SIMOES VILLAS BOAS**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/07/2014 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 50 Machos.
- 50 Fêmeas.

Felis sylvestris catus

- 10 Machos.
- 10 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 16 de julho de 2012

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04023630

ANEXO B- LEITURA E CÓDIGO DO API CORINE

Amostra BR-AD41

API CORYNE V3.0

- - - + - - + - - + - - + + - - - - + +
 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

NIT PYZ PyrA PAL βGUR βGAL αGLU βNAG ESC URE GEL O GLU RIB XYL MAN MAL LAC SAC GLYG CAT
 ↑ 0 ↑ 1 ↑ 1 ↑ 1 ↑ 1 ↑ 3 ↑ 2 ↑ 6 ↑

REFERÊNCIA DATA
 41 18062012
COMENTÁRIO

MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO

Galeria API CORYNE V3.0
Perfil 0 1 1 1 3 2 6
Nota(s)

| Taxons significativos | % ID | T | Teste(s) por aproximação |
|------------------------------------|------|------|--------------------------|
| Corynebacterium ulcerans | 99.7 | 1.0 | |
| Taxon seguinte | % ID | T | Teste(s) por aproximação |
| Corynebacterium pseudotuberculosis | 0.2 | 0.67 | GLYG 1% |

Amostra BR-AD61

API CORYNE V3.0

- - - + - - + - - + + - - - - - + +
 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

NIT PYZ PyrA PAL βGUR βGAL αGLU βNAG ESC URE GEL O GLU RIB XYL MAN MAL LAC SAC GLYG CAT
 ↑ 0 ↑ 1 ↑ 1 ↑ 1 ↑ 1 ↑ 3 ↑ 0 ↑ 6 ↑

REFERÊNCIA DATA
 61.2 Liliane 21-09-2012
COMENTÁRIO

MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO NO GÉNERO

Galeria API CORYNE V3.0
Perfil 0 1 1 1 3 0 6
Nota(s)

| Taxons significativos | % ID | T | Teste(s) por aproximação |
|--|--------------|------|---------------------------------|
| Corynebacterium ulcerans | 96.6 | 0.72 | MAL 99% |
| Corynebacterium pseudotuberculosis | 3.3 | 0.57 | MAL 81% GLYG 1% |
| Taxon seguinte | % ID | T | Teste(s) por aproximação |
| Corynebacterium diphtheriae biotype gravis | 0.1 | 0.0 | NIT 99% PAL 12% URE 0% MAL 100% |
| Teste(s) complementare(s) | TREac | | HEM |
| Corynebacterium pseudotuberculosis | - | | +(-) |
| Corynebacterium ulcerans | + | | - |

APÊNDICE A – TRABALHO APRESENTADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A DISSERTAÇÃO



APÊNDICE B. ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A DISSERTAÇÃO

ORIGINAL PAPER

Corynebacterium ulcerans isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles

Liliane Simpson-Louredo · Juliana Nunes Ramos · Renata Stavracakis Peixoto · Louisy Sanches Santos · Camila Azevedo Antunes · Elisa Martins Ladeira · Cintia Silva Santos · Veronica Viana Vieira · Maria Helena Simões Villas Bôas · Raphael Hirata Jr. · Ana Luíza Mattos-Guaraldi

Received: 2 September 2013 / Accepted: 15 November 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract *Corynebacterium ulcerans* has been increasingly isolated as an emerging zoonotic agent of diphtheria and other infections from companion animals. Since pets are able to act as symptomless carriers, it is also essential to identify virulence potential for humans of these isolates. In this work the ability of *C. ulcerans* to bind to fibrinogen (Fbg), fibronectin (Fn) and Type I collagen as well the genetic relationship among strains isolated from human and asymptomatic dogs in Rio de Janeiro (Brazil) were analyzed. Five pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles were demonstrated (I, II, III, IV and V). In addition, the IV and V profiles exhibiting $\geq 85\%$ similarity were expressed by the BR-AD41 and BR-AD61 strains from companion dogs living in

the same neighborhood. Independent of the PFGE-types, human and dog isolates showed affinity to Fbg, Fn and collagen. Heterogeneity of PFGE profiles indicated endemicity of *C. ulcerans* in the Rio de Janeiro metropolitan area. Differences in the expression of adhesins to the human extracellular matrix may contribute to variations in the virulence and zoonotic potential of *C. ulcerans* strains.

Keywords *Corynebacterium ulcerans* · Dog · Fibrinogen · Fibronectin · PFGE

Introduction

Infection with *Corynebacterium ulcerans* is recognised as an emerging zoonotic disease and there is evidence that the number of cases and the severity of

L. Simpson-Louredo and J. N. Ramos contributed equally for the first authorship in this manuscript.

L. Simpson-Louredo · J. N. Ramos ·
L. S. Santos · C. S. Santos · R. Hirata Jr. ·
A. L. Mattos-Guaraldi (✉)
Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical
Relevance-LDCIC, Collaborating Center for Diphtheria of
CGLAB/SVS/MS, School of Medical Sciences,
Universidade do Estado do Rio de Janeiro—UERJ,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil
e-mail: guaraldi@uerj.br

R. S. Peixoto
Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes,
Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPPG/UFRJ),
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

C. A. Antunes
Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

L. Simpson-Louredo · J. N. Ramos ·
E. M. Ladeira · V. V. Vieira · M. H. S. V. Bôas
National Institute for Quality Control in Health (INCQS),
Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro,
RJ, Brazil

Published online: 27 November 2013

 Springer

clinical signs is increasing in industrialized and developing countries (Dewinter et al. 2005; De Zoysa et al. 2005; Mattos-Guaraldi et al. 2008a; Wagner et al. 2010; Kamada et al. 2012; Urakawa et al. 2013). Human infections by *C. ulcerans* may be fatal and mostly occur in adults with close animal contact (Wellinghausen et al. 2002; Lartigue et al. 2005). Lately, *C. ulcerans* has been increasingly isolated as emerging zoonotic agent from companion animals such as cats and dogs (Dias et al. 2011a; Zakikhany and Efstratiou 2012). There is, therefore, a potentially large reservoir of infection with little knowledge about the risks of zoonotic transmission. The majority of the cases of diphtheria caused by *C. ulcerans* has occurred in adult patients who had been fully or partially immunized with diphtheria toxoid vaccine (Leek et al. 1990; Dias et al. 2011a). In Europe, *C. ulcerans* is currently isolated in more frequency from diphtheria cases than *Corynebacterium diphtheriae* (De Zoysa et al. 2005; Perkins et al. 2010; Taylor et al. 2010; Wagner et al. 2010). *C. ulcerans* does not cause large epidemics and human-to-human transmission remains uncertain (Bonnet and Begg 1999; Mattos-Guaraldi et al. 2008a).

The aim of this study was to investigate the affinity of *C. ulcerans* to human plasma fibrinogen (Fbg), fibronectin (Fn) and Type I collagen as a virulence property. In addition, the antimicrobial susceptibility profiles and the genetic relationship among *C. ulcerans* strains isolated from asymptomatic dogs and a human patient in Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil were also determined.

Materials and methods

Origin of bacterial strains and culture conditions

Three *C. ulcerans* strains isolated from asymptomatic dogs and one from human patient in Rio de Janeiro metropolitan area, during the period of 2000–2012, were analyzed (Table 1): BR-AD41 and BR-AD61 strains currently isolated, respectively, from nares to skin wounds of two domestic dogs in Duque de Caxias city; BR-AD22 strain, previously isolated from nares of a shelter dog in Niterói city (Dias et al. 2010); 809 strain previously isolated from an elderly woman with a fatal pulmonary infection and history of leg skin ulcers in the Rio de Janeiro city (Mattos-Guaraldi et al.

2008a). *C. ulcerans* CDC KC279 strain, *Corynebacterium pseudotuberculosis* 1002 strain; *C. diphtheriae* subsp. *mitis* ATCC 27010 (C7 s (–) tox– [NCTC 11397]) and ATCC 27012 strains were also analyzed for comparison.

To rule out the presence of any infectious or debilitating diseases, including dermatoses and the more obvious physical and behavioral abnormalities, a general assessment of each animal's condition and nutritional status was recorded as previously described (CCAC 2013). Swabs from skin lesions, nares and ears samples from companion to shelter dogs were collected with sterile swabs and inoculated onto the chocolate tellurite agar plates and incubated at 35–37 °C for 72 h as described by Dias et al. (2011b). Stock cultures in 10 % skim milk with 25 % added glycerol were maintained at –70 °C and recovered as required by cultivation in Trypticase Soy Agar (TSA; Difco Laboratories, Detroit, MI.) at 37 °C for 24 h under aerobic conditions (Dias et al. 2010).

Phenotyping, molecular characterization and toxigenicity testing

The identification of *C. ulcerans* strains was achieved using both phenotypic and genotypic methods. Positive bacterial cultures for irregular Gram-positive rods were preliminarily characterized by colonial morphology, pigmentation, hemolysis and DNase activity. The suspect bacterial isolates were identified as *C. ulcerans* by conventional biochemical assays and the semi-automatized API-Coryne System V3.0 (bioMérieux, Lyon, France) with the API web decoding system <http://www.apweb.biomerieux.com> (Efstratiou and George 1999; Funke and Bernard 2007; Pimenta et al. 2008; Dias et al. 2010). The production of phospholipase D (PlD) was evaluated by the CAMP test (i.e., inhibition of hemolysis by *Staphylococcus aureus*).

Molecular identification of the isolates was carried out by a multiplex PCR (mPCR) used to provide simultaneous identification and toxigenicity of these corynebacterial species with zoonotic potential in addition to *C. diphtheriae*, based on primers targeting the following genes: *rpoB* (*Corynebacterium* spp.), *16S rRNA* (*C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*), *pld* (specific for *C. pseudotuberculosis*), *dtxR* (*C. diphtheriae*) and *tox* gene (diphtheria toxin-DT) (Torres et al. 2013).

Table 1 *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from human and asymptomatic dogs in Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil

| <i>C. ulcerans</i> isolates | City/year | Source | Clinical detail | API-Coryne code (probability, T = 0.99) | References |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|---|---|
| Human | | | | | |
| 809 | Rio de Janeiro/2000 | Lung | Fatal pulmonary infection | 0111326 (99.7 %) | Mattos-Guaraldi et al. (2008a), Trost et al. (2011) |
| Dog shelter | | | | | |
| BR-AD22 | Niterói/2010 | Nare | Asymptomatic | 0111324 (7.2 %) | Dias et al. (2010), Trost et al. (2011) |
| Companion | | | | | |
| BR-AD41 | Duque de Caxias/2012 | Tick bite skin lesion | Asymptomatic | 0111326 (99.7 %) | This study |
| BR-AD61 | Duque de Caxias/2012 | Nare | Asymptomatic | 0111306 (96.6 %) | This study |

RJ Rio de Janeiro, DC Duque de Caxias, N Niterói

Antimicrobial susceptibility profiles

The sensitivity to antimicrobial agents (Oxoid, Hampshire, UK), penicillin G (10 U), ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), imipenem (10 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), tetracycline (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), rifampicin (5 µg), linezolid (30 µg) and vancomycin (30 µg) was determined by the disk diffusion method using inoculum equivalent to a 0.5 McFarland standard, according to previously adopted by other authors (Martinez-Martinez et al. 1995; CLSI 2007; Dias et al. 2010). Plates were incubated at 37 °C for 24 h and reconfirmed at 48 h using a cation-adjusted Mueller–Hinton agar with 5 % sheep blood. Breakpoints for the susceptible strains were used as suggested by the CLSI for bacteria excluded from table 2A to 2K. As there is not yet a defined standard for interpreting these results, the one proposed in the CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7) was used (CLSI 2007). The breakpoints for *S. aureus* established by CLSI were considered in the cases of penicillin and ampicillin. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of penicillin G and clindamycin were also evaluated by the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden), as previously described (Martinez-Martinez et al. 1995).

ECM and plasma proteins binding assays

Bacterial binding assays using biotinylated Fbg, Fn and Type I collagen (all from Sigma Chemical Co.)

were performed in 96 wells Elisa Microtiter plates (Costar 96 Well EIA/RIA Plate; Corning, NY, USA). Bacterial cultures grown for 24 h at 37 °C in trypticase soy broth—TSB medium were washed 2× with phosphate buffered saline (PBS), and resuspended in 0.1 M NaHCO₃, pH 9.6 to a suspension of OD 0.2 at λ = 650 nm (equivalent to 5 × 10⁹ CFU/mL). The wells were sensitised with 100 µL of bacterial suspensions for 1 h at 37 °C, and overnight at 8 °C. A standard curve was also performed by diluting the biotinylated protein solutions to concentrations varying from 5 to 0.05 µg (1 h/37 °C). After blocking with 2 % bovine serum albumin (BSA Type V, Sigma) in PBS added of 0.05 % Tween-20 (PBST) for 1 h at 37 °C, the wells were washed 3× with PBST. The bacterial strains were reacted with 20 µg/mL of biotinylated ECM/plasma proteins for 1 h at 37 °C. After washing 3× with PBST, the wells were reacted for 30 min at 37 °C with 0.001 µg/mL Extravidin-peroxidase (Sigma) prepared in PBST 1 % BSA. After washing 3× with PBST, the reaction was verified by adding 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate (TMB, Sigma) for 20 min and the reaction blocked with 50 µL of 1 M HCl. The reaction was read in λ = 450 nm in a microtiter plate reader. The colour intensity of the wells sensitised with the microorganisms was compared to the standard curve by GraphPad Prism 6.0 version. The results were expressed in micrograms of adhered proteins, in a mean ± SD of three independent assays performed in triplicate. The mean of the binding properties were compared by

Tukey's multiple comparison test (Harlow and Lane 1988; Sabbadini et al. 2010).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Genomic DNA was prepared following a method described previously (Baio et al. 2013). The DNA was cleaved with *Sfi*I (New England BioLabs) according to the manufacturer's instructions. PFGE was carried out in 0.5× TRIS–borate–EDTA–1.2 % agarose gels at 13 °C with a CHEF DRII system (Bio-Rad). The pulse times were 1–30 s over 20 h. A lambda DNA concatemer (New England BioLabs) was used as a molecular size marker. Similarities among macrorestriction patterns were identified according to the criteria established by Tenover et al. (1995). The BioNumerics Fingerprinting software (Version 4.0, Applied Math, Sint-Martins-Latem, Belgium) was used to confirm the findings provided by visual observation. The similarity index of the strains was calculated using the Dice correlation coefficient with a band position tolerance of 1 % and unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA) was used to construct a dendrogram. Strains were considered to belong to the same PFGE group if the similarity index was ≥85 % percentage band-based similarity coefficients as cut-off values.

Ethical procedures

The study was performed in compliance with the guidelines outlined in the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and with the Brazilian government's ethical guidelines for research involving animals (Fiocruz Ethic Committee for Animal Experiments-CEUA/FIOCRUZ-LW-64/12).

Results

Corynebacterium ulcerans phenotypic and genotypic characterization

C. ulcerans strains were positive for catalase, urease, alkaline phosphatase and α-glucosidase. Nitrate reduction, pyrazinamidase, gelatinase, and esculin hydrolysis tests gave negative results. Fermentation tests were positive for glucose, ribose; negative for xylose, mannose, sucrose and lactose. Maltose and

glycogen fermentation were variable characteristics. Pld production was demonstrated by the positive reverse CAMP test. Amplification profiles by mPCR identified BR-AD22, BR-AD41 BR-AD61 and 809 Brazilian strains as *C. ulcerans* (Fig. 1) with negative results for *tox* gene.

Antimicrobial susceptibility profiles

C. ulcerans BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 and 809 strains showed moderate susceptibility to penicillin G and clindamycin (Table 2). All *C. ulcerans* strains tested showed susceptibility to other antimicrobial agents tested, including erythromycin and vancomycin.

ECM/plasma proteins binding properties

The ability of *C. ulcerans* to bind to human Fbg, Fn and Type I collagen molecules was demonstrated at varied levels (Fig. 2; Table 2). The three dog isolates (BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 strains) were capable to binding over than 10 % of biotinylated proteins, when reacted with 100 μL of a solution containing 20 μg/mL for 1 h/37 °C. Data showed a higher affinity of the dog isolates BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 strains to Fbg while a higher affinity of BR-AD22 and BR-AD61 strains to Fn; and higher affinity of BR-AD22 to Type I collagen was shown. ELISA results showed the highest affinity to Fbg, Fn and Type I collagen for BR-AD22 strain ($P < 0.001$). Conversely, 809 strain (isolated from a human patient with lethal pneumonia) adhered to human ECM/plasma proteins in lower intensities ($P < 0.001$). CDC KC279 strain adhered to collagen and Fn in similar intensities of BR-AD61 and BR-AD41 strains, respectively ($P > 0.05$). BR-AD41 and BR-AD61 showed similar adherence levels to Fbg ($P > 0.05$).

PFGE analysis

PFGE of the *Sfi*I-digested DNA of 5 strains revealed distinct PFGE profiles which were designated I, II, III, IV and V (Fig. 3). The PFGE profile IV differed by more than three bands from PFGE profile V by visual inspection. According to the interpretation criteria by Tenover et al. (1995), the BR-AD41 strain belonging to profile IV and BR-AD61 strain, profile V were considered related. These strains were isolated from

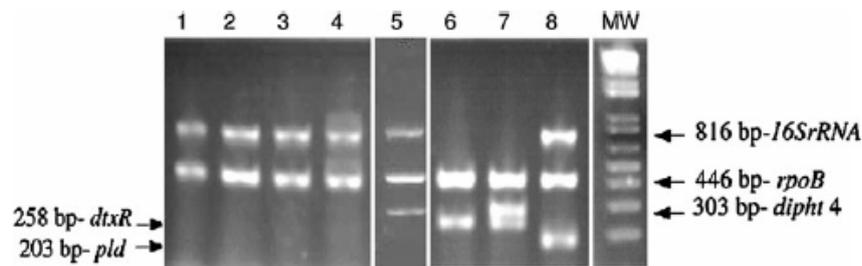


Fig. 1 Amplification profile by multiplex polymerase chain reaction of *Corynebacterium ulcerans* (lanes 1–5), *Corynebacterium diphtheriae* (lanes 6 and 7), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (lane 8); lane 1 BR-AD22 (tox-); 2 BR-AD41

(tox-); 3 BR-AD61 (tox-); 4 809; 5 CDC KC279 (tox+); 6 ATCC 27010 (tox-); 7 ATCC 27012 (tox+); 8 1002 (tox-); 9 molecular weight (100-bp DNA ladder)

Table 2 Phenotypic and genotypic characteristics of *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from human and dogs in Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil (2000–2012)

| Strain number | Antimicrobial agents
Moderate susceptibility to ^b | <i>tox</i> gene/
Pld/
DNAse | Binding (μg) ^c | | | PFGE type |
|-------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| | | | Fbg | Fn | Collagen | |
| CDC KC 279 ^a | Penicillin G (MIC 0.19 ≥ mg/L); clindamycin (MIC ≥ 1.5 mg/L) | + / + / + | 0.2000 ± 0.0005774 | 0.4067 ± 0.006642 | 0.4680 ± 0.01328 | I |
| 809 | Penicillin G, clindamycin | - / + / + | 0.1270 ± 0.003464 | 0.1367 ± 0.007219 | 0.1650 ± 0.02801 | II |
| BR-AD22 | Penicillin G, clindamycin | - / + / + | 0.2690 ± 0.004041 | 0.7160 ± 0.004619 | 0.1650 ± 0.02801 | III |
| BR-AD41 | Penicillin G, clindamycin | - / + / + | 0.2290 ± 0.008660 | 0.3937 ± 0.001453 | 0.3280 ± 0.004041 | IV ^d |
| BR-AD61 | Penicillin G, clindamycin | - / + / + | 0.2370 ± 0.0005774 | 0.6200 ± 0.001386 | 0.4557 ± 0.005487 | V ^d |

NI not informed, PLD phospholipase D, DNAse deoxyribonuclease, Fbg fibrinogen, Fn fibronectin, + positive, - negative

^a Control strain

^b Evaluated by disk diffusion method and E-test

^c Results expressed as a mean of three independent assays performed in triplicate

^d PFGE-types epidemiologically related

dogs in the same neighborhood and exhibited ≥85 % similarity, so they were considered as belonging to the same PFGE group. The other PFGE profiles exhibited more than six bands of difference, indicating that they were epidemiologically unrelated.

Discussion

Toxigenic *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* can lead to life-threatening disease that requires urgent treatment with diphtheria antitoxin (DAT) without waiting for laboratory confirmation. Antibiotic treatment of diphtheria-like illness caused by *C. ulcerans* should follow

clinical guidelines for patients infected with *C. diphtheriae*. An appropriate antibiotic (penicillin or erythromycin) should be used to eliminate the causative organisms, stop exotoxin production and reduce communicability (Pickering et al. 2009; CDC 2011, 2012; Sekizuka et al. 2012). Clindamycin was formerly considered as an alternative in the treatment of the carrier of diphtheria bacilli, especially in those who were sensitive to penicillin (Zamiri and McEntegar 1972).

Similar PFGE profiles or ribotypes have been previously observed in *C. ulcerans* strains isolated from human and animal colonization or infectious processes (Katsukawa et al. 2009, 2012; Komiya et al.

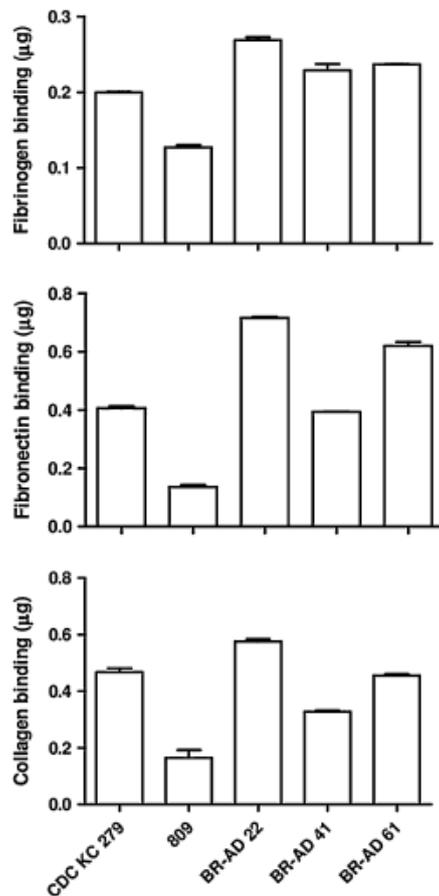


Fig. 2 Binding to human fibrinogen (Fbg), fibronectin (Fn) and Type I collagen by *Corynebacterium ulcerans* evaluated by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): BR-AD22, BR-AD41 and BR-AD61 strains isolated from dogs, 809 strain from human; control CDC KC279 strain. Data showed the highest affinity to Fbg, Fn and Type I collagen for BR-AD22 strain ($P < 0.001$). The results were expressed in mean \pm SD of three independent assays performed in triplicate. The mean of the binding properties were compared by Tukey's multiple comparison test

2010; Berger et al. 2011). In Japan, 45 *C. ulcerans* dog isolates including 39 strains of a predominant PFGE type (A2), showed resistance or decreased sensitivity to clindamycin. The authors suggested that transmission among asymptomatic dogs might have occurred (Katsukawa et al. 2012). In our study, heterogeneity of PFGE profiles observed in strains isolated from human and dogs indicated endemicity of *C. ulcerans* in Rio de Janeiro metropolitan area. *C. ulcerans* strains of five different PFGE types showed moderate susceptibility to penicillin G and clindamycin, as previously

demonstrated for other Brazilian *C. diphtheriae* strains (Pereira et al. 2008). Interestingly, two epidemiologically related PFGE profiles (profiles IV and V) were found in the BR-AD41 and BR-AD61 dog isolates from Duque de Caxias city in 2012.

Virulence mechanisms of *C. ulcerans* should become a matter of higher interest especially due to the increase in the number and severity of cases of infection in immunized or partially immunized individuals. *C. ulcerans* strains seem to be endowed with an array of virulence factors other than DT such as catalase, proteases, deoxyribonuclease (DNase), neuraminidase H (NanH), endoglycosidase E (EndoE), Pld toxin and subunits of adhesive pili of the SpaDEF type (Troost et al. 2011).

Corynebacterium ulcerans strains producing Pld, but not DT toxin, are able to cause severe disease in humans, such as lymphadenitis, dermatitis, subcutaneous abscess and acute pharyngitis and lower respiratory tract infections (pneumonia and granulomatous nodules in pulmonary tissues) (Desseau et al. 1995; Hommez et al. 1999; Hatanaka et al. 2003; Dias et al. 2011a). Consequently, *C. ulcerans* strains unable to produce DT toxin should not be underestimated. Pld may cause an increase in vascular permeability, has dermonecrotic properties, and reduces viability of neutrophils and macrophages (Schmiel and Miller 1999). In an attempt to further investigate possible mechanisms that promote *C. ulcerans* infection and hematogenic dissemination, a previous study revealed a strain-dependent arthritogenic potential independent of catalase, DNase, Pld and DT production. Some *C. ulcerans* strains showed a higher arthritogenic and mortality potential when compared to *C. diphtheriae* strains during an in vivo experimental infection in mice. *C. ulcerans* arthritis also had a hematogenic spread and viable bacteria were recovered from joints, blood, kidneys, liver, and spleen but not from the heart and lungs of mice (Gaede and Heesemann 1995; Tissi et al. 1999; Puliti et al. 2006; Dias et al. 2011b). *C. ulcerans* 809 human isolate (*tox* gene negative) caused skin lesions with a large extent of yellowish-white fibrinous (fibrin) deposits in the lower limb of the patient (Mattos-Guaraldi et al. 2008a). Dermonecrotic activity was also observed for both human 809 and dog BR-AD22 isolates in experiments performed with guinea pigs (Mattos-Guaraldi et al. 2008b).

Comparative analysis of the complete genomes of *C. ulcerans* 809 and BR-AD22 strains and detection of

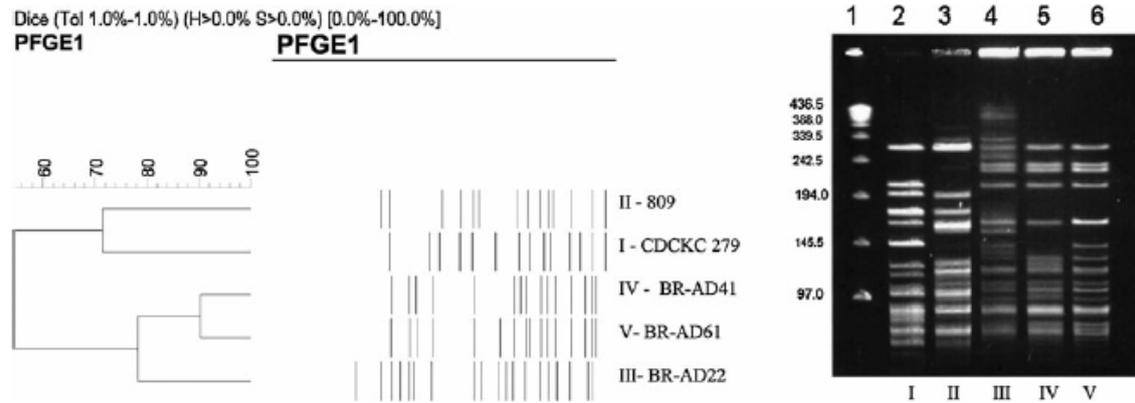


Fig. 3 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of Brazilian *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from human and dogs. **a** Dendrogram of results of PFGE data. The percent similarity scale is based on UPGMA clustering of Dice coefficients generated by BioNumerics software v 4.0; **b** PFGE

assay. Lane 1 λ DNA ladder PFGE marker; lane 2 CDC KC 279 control strain (USA), profile I; lane 3 809 (human), profile II; lane 4 BR-AD22 (dog), profile III; lane 5 BR-AD41 (dog), profile IV; lane 6 BR-AD61 (dog), profile V

candidate virulence factors was recently performed (Troost et al. 2011). The detection and functional assignments of singletons confirmed that the repertoire of potential virulence factors of the sequenced *C. ulcerans* were different in the two selected isolates from a human and animal source (809 and BR-AD22 strains, respectively). Two genes encoding surface-anchored proteins with LPXTG motif, including the SPAD gene for the major pilin subunit of an adhesive pilus structure, were also detected as singletons. SpAD protein of *C. ulcerans* BR-AD22 differs in its amino acid sequence when compared with the functional counterpart CULC809-01952 from *C. ulcerans* 809, demonstrated that pili of the two *C. ulcerans* strains varied significantly in the primary sequence of their major pilins that in principle constitute the shaft of the corynebacterial pilus structure. Data suggested differences in the adhesive properties of *C. ulcerans* strains.

The first step in the infectious process of extracellular pathogens like *C. diphtheriae* is generally considered to be attachment to and colonization of host tissue surfaces. Evidence from other Gram-positive pathogens suggests that bacterial surface adhesins recognizing adhesive matrix molecules or plasma proteins may serve as potential antigenic candidates for the development of novel immunotherapies, including diphtheria-like illness and invasive infections caused by *C. ulcerans* (Rivera et al. 2007).

Fbg is a major protein in human plasma that has its synthesis dramatically upregulated during inflammation

or under exposure to stress such systemic infections. It is, therefore, not surprising that many bacterial pathogens can interact with Fbg and manipulate its biology (Rivera et al. 2007). Fbg is primarily involved in the coagulation cascade system through its conversion to insoluble fibrin. Both Fbg and fibrin play overlapping roles in blood clotting, fibrinolysis, inflammatory response, cellular and matrix interactions and wound healing. Many bacterial pathogens exploit mechanisms involved in coagulation systems to colonize exposed tissue matrix proteins or evade immune mechanisms of bacterial clearance (Doolittle 1984; Lantz et al. 1985; Mosesson 2005; Sun 2006). The presence of Fbg onto bacterial surfaces may be an efficient trait to avoid phagocytosis in human hosts, as previously described with other Gram-positive pathogens (Schubert et al. 2002; Rennermalm et al. 2004; Pierno et al. 2006), including *C. diphtheriae* (Gomes et al. 2009; Sabbadini et al. 2010).

Fn is a complex glycoprotein found in a soluble form in many body fluids (blood, saliva) and in an insoluble form as a component of cell surfaces, basement membranes, and the extracellular matrices. Soluble plasma Fn interacts with various bacteria and cell surfaces. Fn may serve as a receptor in the adherence of bacteria to host epithelial cell and may play an important role in tissue tropism. Fn can simultaneously bind to Fbg, fibrin, collagen, human cells and bacteria (Mosher 1975; Ruoslahti and Vaheri 1975; Engvall and Ruoslahti 1977; Engvall et al. 1978;

Livomese and Korzeniowski 1992). Type I collagen is the most prevalent form of several distinct types of collagen observed in the arterial walls, bone, dentin, dermis, tendon, and uterine wall. All types of collagen are active in Fn binding, but to a different degrees (Engvall et al. 1978). The binding to collagen and Fbg is mediated by the same binding site in Fn.

The ability of all five PFGE-types of *C. ulcerans* to bind to human Fbg, Fn and Type I collagen molecules was demonstrated, but at varied levels. Similar to *C. diphtheriae*, qualitative and quantitative differences in the expression of Fbg, Fn and Type I collagen-binding adhesins may contribute to variations in the virulence potential to the human host and pseudomembrane formation by *C. ulcerans* strains (Sabbadini et al. 2010). The fact that the animal isolates adhered to human ECM/plasma proteins in higher intensities indicated that some *C. ulcerans* strains have evolved mechanisms to target human defense, resulting in a microbial invasion of cells constitutive of host barriers, disruption of barrier integrity, and systemic dissemination and invasion of deeper tissues.

Acknowledgments This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde-Fundação Oswaldo Cruz (PAPES V-FIOCRUZ), Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR-2/UERJ).

Conflict of interest The authors declare that they no have conflict of interest.

References

- Baio PV, Mota HF, Freitas AD et al (2013) Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:23–29
- Berger A, Huber I, Merbecks SS et al (2011) Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in woman and cat. *Emerg Infect Dis* 17:1767–1768
- Bonnet JM, Begg NT (1999) Control of diphtheria: guidance for consultants in communicable disease control. *Commun Dis Public Health* 2:242–249
- Canadian Council on Animal Care (CCAC) (2013) Guidelines on: procurement of animals used in science. <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Procurement.pdf>. Accessed 10 Mar 2013
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011) Respiratory diphtheria-like illness caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans*—Idaho, 2010. *MMWR* 60:77
- Centers for Disease Control and Prevention (2012) Health information for international travel. Oxford University Press, New York
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, approved guideline. CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7:4–6)
- De Zoysa A, Hawkey PM, Engler K, George R et al (2005) Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 43:4377–4381
- Desseau RB, Brandt-Christensen M, Jensen OJ, Tonnesen P (1995) Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. *Eur Respir J* 8(4):651–653
- Dewinter LM, Bernard KA, Romney MG (2005) Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. *J Clin Microbiol* 43:3447–3449
- Dias AASO, Silva FC Jr, Pereira GA, Souza MC et al (2010) *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 743–748
- Dias AASO, Santos LS, Sabbadini PS, Santos CS et al (2011a) *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Rev Saúde Pública* 45:1176–1191
- Dias AASO, Silva FC Jr, Santos LS, Ribeiro-Carvalho MM et al (2011b) Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. *Vet Microbiol* 53:323–331
- Doolittle RF (1984) Fibrinogen and fibrin. *Annu Rev Biochem* 53:195–229
- Efstratiou A, George RC (1999) Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. *Commun Dis Public Health* 2:250–257
- Engvall E, Ruoslahti E (1977) Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* 20:1–5
- Engvall E, Ruoslahti E, Miller EJ (1978) Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J Exp Med* 147:1584–1595
- Funke G, Bernard AK (2007) Coryneform Gram-positive rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds) *Manual of clinical microbiology*, 9th edn. ASM Press, Washington, DC, pp 485–514
- Gaede KI, Heesemann J (1995) Arthritogenicity of genetically manipulated *Yersinia enterocolitica* serotype O8 for Lewis rats. *Infect Immun* 63:714–719
- Gomes DL, Martins CA, Faria LM, Santos LS et al (2009) *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol* 58: 1419–1427

- Harlow E, Lane D (1988) Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Hatanaka A, Tsunoda A, Okamoto M, Ooe K et al (2003) *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. *Emerg Infect Dis* 9:752–753
- Hommez J, Devriese LA, Vanechoutte M, Riegel P et al (1999) Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 37:954–957
- Kamada T, Hatanaka A, Tasaki A, Honda K et al (2012) Case of caused by *Corynebacterium ulcerans* in Ibaraki Prefecture. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 115:682–686
- Katsukawa C, Kawahara R, Inoue K, Ishii A et al (2009) Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from the domestic dog for the first time in Japan. *Jpn J Infect Dis* 62:171–172
- Katsukawa C, Komiya T, Yamagishi H, Ishii A et al (2012) Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka. *J Med Microbiol* 61:266–273
- Komiya T, Yukiji C, De Zoysa A, Masaaki I et al (2010) Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. *J Med Microbiol* 59:1497–1504
- Lantz MS, Switalski LM, Kommam KS, Höök M (1985) *Bacteroides intermedius* binds fibrinogen. *J Bacteriol* 163:623–628
- Lartigue MF, Monnet X, Lê Fleche A, Grimont PA et al (2005) *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. *J Clin Microbiol* 43:999–1001
- Leek MD, Sivaloganathan S, Devaraj SK, Zamiri I et al (1990) Diphtheria with a rare difference *Corynebacterium* fatality with associated apoptotic cell death. *Histopathology* 6(2):187–189
- Livomese LL, Korzeniowski OM (1992) Pathogenesis of infective endocarditis. In: Kaye D (ed) *Infective endocarditis*, 2nd edn. Raven Press, New York, pp 19–35
- Martinez-Martinez L, Ortega MC, Suarez AL (1995) Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 33:1318–1321
- Mattos-Guaraldi AL, Sampaio JLM, Santos CS, Pimenta FP et al (2008a) First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:396–400
- Mattos-Guaraldi AL, Villas-Boas MHS, Dias AASO, Silva Jr FC et al (2008b) *Corynebacterium ulcerans* infecting humans and dogs in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. Presented at the proceedings of the second annual meeting of DIPNET & tenth international meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Lamaca, Cyprus, 61
- Mosesson MW (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3:1894–1904
- Mosher DF (1975) Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J Biol Chem* 250:6614–6621
- Pereira A, Pimenta FP, Santos FRW, Damasco PV et al (2008) Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:507–510
- Perkins SL, Cordery R, Nixon G, Abrahams A et al (2010) Investigations and control measures following a non-travel-associated case of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*, London, United Kingdom, December 2009–January 2010. *Euro Surveill* 15(16):19544
- Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS (2009) Diphtheria. Red book: 2009 report of the committee on infectious diseases, 28th edn. American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, pp 280–283
- Piemo M, Maravigna L, Piazza R, Visai L, Speziale P (2006) FbsA-driven fibrinogen polymerization: a bacterial “deceiving strategy”. *Phys Rev Lett* 96(2):028108. doi:10.1103/PhysRevLett.96.028108
- Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata RJr et al (2008) DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* 46:307–311
- Puliti M, Hunolstein CV, Marangi M, Bistoni F et al (2006) Experimental model of infection with nontoxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis. *J Med Microbiol* 55:229–235
- Rennermalm A, Nilsson M, Flock JI (2004) The fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis* is a target for opsonic antibodies. *Infect Immun* 72:3081
- Rivera J, Vannakambadi G, Höök M, Speziale P (2007) Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb Haemost* 98:503–511
- Ruoslahti E, Vaheiri A (1975) Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma. *J Exp Med* 141:497–501
- Sabbadini PS, Genovez MR, Silva CF, Adelino TL et al (2010) Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:706–711
- Schmiel DH, Miller VJ (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect* 1:1103–1112
- Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R et al (2002) A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units novel ligand binding sites. *Mol Microbiol* 46:557–569
- Sekizuka T, Yamamoto A, Komiya T, Kenri T et al (2012) *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. *BMC Microbiol* 12:72. doi:10.1186/1471-2180-12-72
- Sun H (2006) The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)* 21:281–288
- Taylor J, Saveadra-Campos M, Harwood D, Pritchard G et al (2010) Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection in a veterinary student in London, United Kingdom. *Euro Surveill* 15:1–3
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA et al (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239
- Tissi L, Puliti M, Barluzzi R, Orefici G et al (1999) Role of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1b, and interleukin-6 in a mouse model of group B streptococcal arthritis. *Infect Immun* 67:4545–4550
- Torres LFC, Ribeiro D, Hirata R Jr, Pacheco LG et al (2013) Multiplex PCR for identification and toxigenicity of

- Corynebacterium* group of zoonotic potential and an overview of human and animal infections. Mem Inst Oswaldo Cruz 108(3):272–279
- Trost E, Al-Dilaimi A, Papavasiliou P, Schneider J et al (2011) Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. BMC Genomics 12:383. doi:10.1186/1471-2164-12-383
- Urakawa T, Seto J, Yamamoto A, Nakajima T et al (2013) Subcutaneous abscess formation in the upper extremity caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. J Med Microbiol 62:489–493
- Wagner KS, White JM, Neal S, Crowcroft NS et al (2010) Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. Epidemiol Infect 138:1519–1530
- Wellinghausen N, Sing A, Kern WV, Perner S et al (2002) A fatal case of necrotizing sinusitis due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. Int J Med Microbiol 292:59–63
- Zakikhany K, Efstratiou A (2012) Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. Future Microbiol 7:595–607
- Zamiri I, McEntegar MGT (1972) The sensitivity of diphtheria bacilli to eight antibiotics. J Clin Path 25:716–717